



**CRISTINA MANUELA
DIAS MESQUITA**

**MATRIZES DE QUITOSANO/GRÂNULOS BIFÁSICOS
PARA LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS**



**CRISTINA MANUELA
DIAS MESQUITA**

**MATRIZES DE QUITOSANO/GRÂNULOS BIFÁSICOS
PARA LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica das Doutoradas Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida e Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa, Professoras Auxiliares do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica.

o júri

Presidente

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor associado com agregação no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

Vogais

Prof.^a Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques

Professora investigadora auxiliar no Departamento de Engenharia de Mecânica

Prof.^a Doutora Maria Margarida Tavares Lopes de Almeida

Professora auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

Prof.^a Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa

Professora auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

agradecimentos

Durante este ano dediquei todo o meu esforço e concentração à elaboração deste trabalho. Para tal foi necessário o carinho e encorajamento de várias pessoas.

Às minhas orientadoras, pelo incansável apoio, dedicação e ajuda.

Ao Doutor Pedro Gomes do laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária do Porto.

Aos Engenheiros Ana, Maria João, Célia, Marta e Bruno e ao Sr. Jacinto e Sr. Octávio do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica por todo o apoio e disponibilidade prestados.

À Engenheira Celeste do Departamento de Química e Engenheira Lina do Laboratório Central de Análises.

Ao grupo do BioLab e à Carla Silva por toda a ajuda e conhecimento que me transmitiram.

Aos colegas de trabalho no laboratório pelo companheirismo.

Aos amigos de mestrado por estes dois anos em Aveiro repletos de aventuras e amizade.

Aos restantes amigos e de um modo muito especial ao Miguel pela paciência, compreensão e ternura.

Ao meu irmão, pela preocupação, carinho, sabedoria e experiência de vida que me foi transmitida para atingir os meus objetivos.

E finalmente, quero agradecer aos meus queridos pais, pela pessoa que me formaram e por todo o apoio prestado ao longo da minha vida. Sem eles, não conseguiria atingir esta nova etapa.

A todos que de certa forma se cruzaram na minha vida, um muito Obrigado.

palavras-chave

Hidroxiapatite, β -fosfato tricálcico, Fosfatos de cálcio bifásicos, CaP, Quitosano, *Scaffolds*, Bioatividade, Propriedades Mecânicas, Sistemas de Liberação Controlada, Dexametasona, culturas celulares da linha MG-63

resumo

Um dos grandes desafios no campo da engenharia de tecidos (ET) é o desenvolvimento de estruturas porosas tridimensionais (*scaffolds*) que permitam a adesão e a proliferação celular bem como a produção de matriz extracelular à taxa a que decorre a degradação do *scaffold*.

Para algumas aplicações biomédicas, o comportamento de degradação da hidroxiapatite sintética pode ser muito lento tornando-se necessários fosfatos de cálcio (CaP) com uma taxa de reabsorção mais rápida com o objetivo de acelerar o processo de substituição óssea. Por esta razão, compostos de β -fosfato tricálcico (β -TCP) e hidroxiapatite (HAp), os chamados fosfatos de cálcio bifásicos (BCP), que combinam a excelente bioatividade da HAp com a boa reabsorção do β -TCP são candidatos interessantes para a substituição óssea e para sistemas de liberação controlada de fármacos.

No presente trabalho produziram-se, por atomização, três tipos de grânulos de CaP, isto é, HAp e bifásicos (β -TCP/HAp) com diferentes proporções (β -TCP/HAp), carregados com um fármaco modelo, a dexametasona (DEX), e procedeu-se à sua incorporação em matrizes de quitosano (CH) reforçadas com um agente reticulante, o glutaraldeído. As matrizes foram obtidas por congelamento e liofilização. A estrutura morfológica dos *scaffolds* e a evolução das fases cristalinas foram examinadas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e difração de raio-X (DRX) respetivamente. Utilizou-se também a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para avaliar as ligações químicas. A porosidade dos *scaffolds* foi avaliada pelo método de deslocamento do líquido tendo o álcool como o líquido de deslocamento. Os *scaffolds* foram também submetidos a ensaios de compressão, para determinar a resistência mecânica, avaliando-se o efeito da inclusão de diferentes CaP (grânulos de HAp e bifásicos β -TCP/HAp com diferentes proporções) e da incorporação do glutaraldeído nas propriedades mecânicas.

Obtiveram-se *scaffolds* com porosidade superior a 75% e tamanho de poro na gama de 50-500 μ m e verificou-se que a presença de glutaraldeído (GA) e a incorporação de grânulos de CaP na matriz polimérica de CH aumentam a sua resistência mecânica.

Verifica-se ainda uma melhoria da resistência à compressão e do módulo de Young dos *scaffolds* com o aumento do teor em β -TCP, aumentando a resistência de compressão de 0,11MPa para 0,45MPa e o módulo de Young de 0,27 para 2,79MPa com a incorporação de grânulos bifásicos com um teor elevado (70%) de β -TCP.

Construíram-se perfis de liberação da DEX em solução tampão de fosfatos (PBS) por determinação da sua concentração por espectroscopia no ultravioleta visível (UV/Vis) a um comprimento de onda de 242 nm. Efetuaram-se também ensaios de bioatividade em soluções simuladoras do plasma humano (SBF) para se avaliar a formação de camada apatítica, determinando-se as concentrações de cálcio (Ca) e fósforo (P) por plasma de acoplamento indutivo (ICP). O estudo do comportamento bioativo dos *scaffolds* evidenciou o contributo das partículas de CaP para a bioatividade do *scaffold*. Os *scaffolds* compósitos em que coexistem β -TCP e HAp evidenciaram um perfil de liberação de fármaco mais lento e bioatividade superior à dos *scaffolds* compósitos de HAp.

Avaliou-se o comportamento de culturas celulares da linha MG-63 na presença dos diferentes *scaffolds*, num modelo de cultura indireto, para avaliação da proliferação/viabilidade e morfologia celulares. A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT.

A inclusão de fosfatos de cálcio nos *scaffolds* de quitosano pareceu melhorar o seu desempenho biológico, verificando-se que nos *scaffolds* compósitos com grânulos bifásicos a proporção de β TCP/HAp de 50:50 pareceu induzir a resposta biológica mais adequada.

Os *scaffolds* produzidos no presente trabalho apresentam-se pois como estruturas promissoras para aplicação em ET ósseo e simultaneamente como sistemas de liberação controlada de fármacos.

keywords

Hydroxyapatite, β -tricalcium Phosphate, Biphasic Calcium Phosphates, CaP, Chitosan, Scaffolds, Bioactivity, Mechanical Properties, Drug Delivery, Dexamethasone, MG-63 cell lines.

abstract

One of the big challenges in tissue engineering (TE) is the development of three-dimensional porous structures (scaffolds) to enable cell adhesion and proliferation and the production of extracellular matrix at a rate equal to the degradation rate of the scaffold.

For some biomedical applications, the degradation behavior of synthetic hydroxyapatite can be very slow and calcium phosphates (CaP) with a higher rate of resorption may be required in order to speed up the process of bone replacement. Therefore, β -tricalcium phosphate (β -TCP) and hydroxyapatite (HAp) compounds, the so-called biphasic calcium phosphate (BCP), which combine the excellent bioactivity of HAp with the good resorption rate of β -TCP are interesting candidates for bone replacement and for controlled drug release systems. In the present study three types of CaP granules, i.e. HAp and biphasic (β -TCP/HAp) of varying proportions, loaded with a model drug, dexamethasone (DEX), were obtained by spray-drying and incorporated in chitosan (CH) matrices reinforced with a crosslinking agent, the glutaraldehyde. The matrices were obtained by freezing and lyophilization. The morphology of the scaffolds and the development of crystalline phases were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) respectively. Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) was also used to identify the chemical bonds. Porosity was evaluated by a displacement fluid measurement, using alcohol as the displacement liquid. The scaffolds were submitted to compression tests to evaluate their mechanical strength, and the effect of different CaP (HAp granules and biphasic (β -TCP/HAp) of varying proportions) and of glutaraldehyde incorporation on their mechanical properties was estimated.

Macroporous scaffolds with a pore size ranging from 50 to 500 μm , and porosity higher than 75% were obtained and the presence of glutaraldehyde (GA) and the CaP granules incorporation on the polymer matrix revealed to enhance the mechanical strength of the scaffolds.

Furthermore, an improvement in the compressive strength and in the Young's modulus of the scaffolds with the increase of β -TCP content is observed: when biphasic granules with a high content (70%) of β -TCP are incorporated into the CH scaffolds the compressive strength increases from 0.11 MPa to 0.45 MPa and the Young's modulus from 0.27 to 2.79 MPa.

The release profiles of DEX were determined in phosphate-buffered solution (PBS) and the evaluation of DEX concentration in the releasing medium was carried out by ultraviolet visible (UV/V) spectroscopy at the wavelength of 242 nm.

Bioactivity studies were performed in simulated body fluid (SBF) solutions to evaluate the formation of the apatitic layer, and inductively coupled plasma spectroscopy (ICP) was used to monitor the Ca and P concentration variations in SBF solutions. CaP granules revealed to play a significant influence on the bioactivity of the CH scaffolds engineered with a CaP based drug delivery system. Besides, composite scaffolds where biphasic granules are present revealed a slower release drug profile and higher bioactivity than the composite scaffolds of CH with HAp.

The behavior of MG-63 cell cultures in the presence of the different scaffolds was evaluated by an indirect culture model for the assessment of cells proliferation/viability and morphology. The proliferation / cell viability was assessed by MTT assay.

The incorporation of calcium phosphates in the chitosan scaffolds seemed to improve their biological performance. Furthermore, a (β -TCP/HAp) ratio equal to (50/50) of the biphasic granules in the composite scaffolds appeared to induce the most appropriate biological reaction.

The scaffolds produced in this work were found to be promising for application in both ET and controlled release systems for drugs

Índice

| | |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| ABREVIATURAS | ix |
| CAPÍTULO 1 Introdução | 1 |
| CAPÍTULO 2 Revisão da Literatura | 5 |
| 2.1. Osso humano..... | 5 |
| 2.2. <i>Scaffolds</i> para regeneração óssea..... | 7 |
| 2.2.1. Morfologia..... | 9 |
| 2.2.2. Biocompatibilidade | 11 |
| 2.2.3. Bioatividade | 12 |
| 2.2.4. Biodegradabilidade..... | 12 |
| 2.3. <i>Scaffolds</i> e a escolha de materiais | 13 |
| 2.3.1. Polímeros..... | 13 |
| 2.3.2. Cerâmicos..... | 18 |
| 2.4. Métodos de preparação de <i>scaffolds</i> | 20 |
| 2.4.1. Separação de fase sólido/líquido | 22 |
| 2.4.2. Liofilização..... | 23 |
| 2.5. Sistemas de libertação controlada de fármacos | 24 |
| 2.5.1. <i>Scaffolds</i> como SLCF..... | 25 |
| 2.5.2. Formas de imobilização do fármaco | 25 |
| 2.5.3. Mecanismos de libertação do fármaco | 26 |
| 2.5.4. Fármaco Dexametasona | 31 |
| CAPÍTULO 3 Formulação do Problema | 39 |
| CAPÍTULO 4 Procedimento Experimental | 41 |
| 4.1. Materiais e reagentes..... | 42 |
| 4.2. Métodos de preparação e técnicas de caracterização..... | 43 |
| 4.2.1. Preparação e caracterização dos grânulos de fosfato de cálcio..... | 43 |
| 4.2.2. Preparação e caracterização dos <i>scaffolds</i> compósitos | 45 |
| 4.3. Estudos de libertação de fármaco e testes <i>in vitro</i> | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.1. Liberação em PBS | 48 |
| 4.3.2. Captação de água e degradação em PBS | 49 |
| 4.3.3. Testes <i>in vitro</i> | 50 |
| 4.4. Biocompatibilidade..... | 52 |
| CAPÍTULO 5 Resultados e Discussão..... | 55 |
| 5.1. Caracterização dos materiais | 55 |
| 5.1.1. β -TCP..... | 55 |
| 5.1.2. HAp..... | 57 |
| 5.2. Caracterização dos pós atomizados | 59 |
| 5.3. Caracterização dos <i>scaffolds</i> compósitos | 62 |
| 5.3.1. Propriedades mecânicas | 67 |
| 5.4. Liberação da DEX | 69 |
| 5.4.1. Grânulos e <i>scaffolds</i> compósitos..... | 69 |
| 5.4.2. Captação de água e degradação | 78 |
| 5.5. Bioatividade..... | 79 |
| 5.6. Biocompatibilidade..... | 86 |
| CAPÍTULO 6 Conclusões e Trabalho Futuro..... | 89 |
| REFERÊNCIAS | 93 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Variação da concentração de fármaco no plasma sanguíneo: fármaco administrado pela via convencional (A) <i>versus</i> fármaco entregue por um sistema de libertação controlada (B). | 1 |
| Figura 2 – Técnica da Engenharia de Tecidos..... | 2 |
| Figura 3 – Estrutura do osso compacto e osso trabecular..... | 6 |
| Figura 4 – Representação esquemática da implantação de um <i>scaffold</i> na zona do tecido lesado, <i>in vivo</i> | 8 |
| Figura 5 – Representação esquemática da formação de novo tecido <i>in vitro</i> | 8 |
| Figura 6 – Influência da arquitetura do <i>scaffold</i> na ligação e espalhamento celular. As células (1) ligam-se a sinais específicos (2) presentes nos <i>scaffolds</i> através de recetores (3) presentes na membrana celular..... | 10 |
| Figura 7 - Estrutura molecular a) da quitina a) e b) do quitosano. | 14 |
| Figura 8 – Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído. | 16 |
| Figura 9 – Micrografias de SEM de <i>scaffolds</i> de quitosano após A) e B) 1 semana, C) e D) duas semanas e E) e F) 12 semanas de implantação em ratinhos de laboratório verificando-se a formação de tecido hospedeiro entre os poros ao longo do tempo..... | 17 |
| Figura 10 - Micrografias, obtidas por micro-CT, de <i>scaffolds</i> de quitosano após A) 1 semana e B) 12 semanas de implantação em ratinhos de laboratório. | 17 |
| Figura 11 - Formação da camada apatítica em <i>scaffolds</i> de CH/poli(D,L-láctico-co-glicólico após 28 dias de imersão em SBF. | 18 |
| Figura 12 - <i>Scaffolds</i> porosos desenvolvidos por a) <i>gas foaming</i> , b) sinterização de microesferas e c) <i>electrospinning</i> | 22 |
| Figura 13 - Formas de imobilização do fármaco em matrizes transportadoras..... | 26 |
| Figura 14 - Etapas do comportamento dos sistemas matriciais hidrofílicos quando intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação e intumescimento da matriz, 3) e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz, diminuição do núcleo seco e início da erosão da matriz polimérica; 5) aumento da erosão e 6) separação das cadeias poliméricas com libertação do fármaco restante. | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura 15 - Esquema ilustrativo das frentes de movimento (intumescimento, difusão e erosão) durante a libertação de fármacos a partir de sistemas matriciais intumescíveis: zona 1 – polímero no estado seco, zona 2 e 3 – polímero no estado maleável (ou de gel). | 30 |
| Figura 16 - Estrutura química da DEX..... | 31 |
| Figura 17 – Tomografia computadorizada (A) e perfil de Hounsfield (B) do (i) defeito vazio (sem HAp), do (ii) controlo, HAp (sem microesferas), e de (iii) microesferas de PLGA carregas com DEX e incorporadas em <i>Scaffolds</i> de HAp após 10 semanas de implantação no fémur de cães. No gráfico da escala de Hounsfield estão representados os dados referentes ao volume ósseo (barras do lado esquerdo) e à densidade óssea (barras do lado direito). | 32 |
| Figura 18 – Perfil de libertação da DEX a partir de <i>scaffolds</i> de CH preparados pelo método do fluido supercrítico. | 33 |
| Figura 19 - Perfil de libertação do 5FU a partir de <i>scaffolds</i> de CH com diferentes concentrações de a) 5FU e b) GA. | 34 |
| Figura 20 – Perfis de libertação da DEX a partir de <i>scaffolds</i> de amido e PLLA, preparados pelo método do fluido supercrítico, com diferentes concentrações de fármaco: ■ 5%; ◇ 10% e * 15% (massa de fármaco/massa de polímero) | 35 |
| Figura 21 - Libertação do metronidazol a partir de <i>scaffolds</i> compósitos de PLLA/HAp carregados com o fármaco. Os triângulos correspondem a <i>scaffolds</i> sem PLLA; os círculos e os losangos aos <i>scaffolds</i> com 20 e 29% de PLLA, respetivamente. | 36 |
| Figura 22 – Fluxograma do procedimento experimental. | 42 |
| Figura 23 – Atomizador laboratorial Mini Spray Dryer Buchi-191..... | 44 |
| Figura 24 – a) e b) Equipamento utilizado para liofilização de <i>scaffolds</i> | 46 |
| Figura 25 - Ensaio da resistência mecânica dos <i>scaffolds</i> | 47 |
| Figura 26 – Curvas de distribuição granulométrica das partículas de β -TCP: —pó inicial e após vários períodos de moagem, — 1h30min, — 3h, — 5h, — 9h e — 48h. | 55 |
| Figura 27 - Distribuição granulométrica após — 48 e — 72h de moagem do β -TCP..... | 56 |
| Figura 28 - Micrografias de SEM de partículas de β -TCP: a) partículas de β -TCP inicial e b) partículas de β -TCP após 48h de moagem..... | 56 |
| Figura 29 - Difratoograma de raio-X do β -TCP: a) pó inicial e b) após 48h de moagem. ... | 57 |
| Figura 30 - Micrografia de SEM das partículas da suspensão inicial de HAp..... | 58 |
| Figura 31 – Difratoograma de raio-X das partículas da suspensão inicial de HAp. | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 32 - Difratoograma de raio-X dos fosfatos de cálcio atomizados: a) HAp, b) β -TCP, c) bifásicos 50-50 e d) bifásicos 70-30. | 59 |
| Figura 33 – Micrografias de SEM de HAp: a) partículas iniciais de HAp e b) grânulos de HAp atomizados. | 60 |
| Figura 34 - Micrografias de SEM de a) partículas iniciais de β -TCP, b) β -TCP após 48h de moagem e c) β -TCP após atomização. | 60 |
| Figura 35 - Micrografias de SEM dos grânulos de hidroxiapatite ((a), d), g) e j)), grânulos bifásicos 50-50 ((b), e), h) e k)) e grânulos bifásicos 70-30((c), f), i) e l)). | 61 |
| Figura 36 - Micrografias de SEM de <i>scaffolds</i> a) de CH puros e b) CH+0,01%GA. | 63 |
| Figura 37 – Difratoograma de raio-X dos <i>scaffolds</i> compósitos a) de HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30. | 64 |
| Figura 38 – Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> compósitos de CH e grânulos de fosfatos de cálcio: grânulos de HAp ((a), d), e g)), grânulos bifásicos 50-50 ((b), e) e h)) e grânulos bifásicos 70-30((c), f) e i)). | 65 |
| Figura 39 – Micrografias de SEM da parede de poro dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30. | 66 |
| Figura 40 – Espectros de FTIR dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30. | 67 |
| Figura 41 – Comportamento mecânico dos diferentes <i>scaffolds</i> compósito de CH/HAp+GA, CH/Bifásicos 50-50+GA e CH/Bifásicos 70-30+GA. Para efeitos de comparação estão também ilustrados os comportamentos dos <i>scaffolds</i> de quitosano e de (quitosano+glutaraldeído). | 68 |
| Figura 42 - Reticulação do quitosano com o glutaraldeído com formação da base de Schiff. | 68 |
| Figura 43 – Perfil de liberação da DEX a partir dos grânulos (—•—) de HAp, (—■—) Bifásicos 50-50 e (—▲—) Bifásicos 70-30 baseado em a) quantidade absoluta de fármaco libertado e b) percentagem de fármaco libertado. | 70 |
| Figura 44 - Ampliação da Figura 43 a) para um tempo de liberação mais curto ($t \leq 1h$). .. | 70 |
| Figura 45 – Micrografias de SEM dos grânulos de a), d), g) e j) hidroxiapatite, b), e), h) e k) bifásicos 50-50 e c), f), i) e l) bifásicos 70-30 após 8 dias de liberação da DEX em PBS. | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 46 - Perfil de liberação da DEX, nos <i>scaffolds</i> compósitos, baseado em a) quantidade absoluta de fármaco libertado e b) percentagem cumulativa de liberação. | 73 |
| Figura 47 - Ampliação da Figura 46 a) para um tempo de liberação mais curto ($t \leq 30\text{min}$). | 73 |
| Figura 48 – Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) e d) HAp, b) e e) Bifásicos 50-50 e c) e f) Bifásicos 70-30 após 30 dias de liberação em PBS..... | 76 |
| Figura 49 – Difratoograma de raio-X dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após 30 dias de liberação em PBS. | 77 |
| Figura 50 - Ampliação do difratograma de raio-X da Figura 49 b) e c). | 77 |
| Figura 51 - Espetro FTIR dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-5 e c) Bifásicos 70-30 após 30 dias de liberação do fármaco (DEX) em PBS. | 78 |
| Figura 52 - Variações de concentração de a) cálcio e b) fósforo no meio de imersão dos três tipos de <i>scaffolds</i> compósitos estudados: a) variação de Ca^{2+} e b) variação de PO_4^{3-} . 80 | |
| Figura 53 - Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> compósitos de HAp: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias de imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i)..... | 82 |
| Figura 54 - Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> compósitos Bifásicos 50-50: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias da imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i). | 83 |
| Figura 55 - Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> compósitos Bifásicos 70-30: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias de imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i). | 84 |
| Figura 56 – Difratoograma de raio-X dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após imersão de 21 dias em SBF..... | 85 |
| Figura 57 - Espetro de FTIR dos <i>scaffolds</i> compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após 21 dias de imersão em SBF. | 85 |
| Figura 58 – <i>Scaffolds</i> compósitos em meios de cultura; as amostras do lado esquerdo dizem respeito aos <i>Scaffolds</i> de CH+0,01%GA e as amostras do lado direito aos <i>scaffolds</i> apenas de CH..... | 86 |
| Figura 59 – Micrografias, obtidas através de microscópio ótico, dos meios de cultura após 2 e 5 dias na presença dos <i>scaffolds</i> de material base (CH+GA) e dos <i>scaffolds</i> compósitos de CH/Fosfatos de cálcio+GA..... | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Resumo das propriedades mecânicas e porosidade do osso humano..... | 7 |
| Tabela 2 – Exemplos de algumas técnicas de fabricação de <i>scaffolds</i> | 21 |
| Tabela 3 - Reagentes usados na preparação da solução SBF. | 51 |
| Tabela 4 – Identificação dos <i>scaffolds</i> e dos materiais utilizados na respetiva fabricação. | 63 |
| Tabela 5 - Bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros apresentados na Figura 40..... | 67 |
| Tabela 6 - Captação de água e degradação dos <i>scaffolds</i> compósitos após 30 dias de libertação em PBS. | 79 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| BET | : modelo de Brunauer, Emmet e Teller |
| CH | : Quitosano |
| DEX | : Dexametasona |
| DRX | : Difração de raio-X |
| ET | : Engenharia de Tecidos |
| FTIR | : Transformada de Fourier no infravermelho |
| GA | : Glutaraldeído |
| HAp | : Hidroxiapatite |
| ICP | : Plasma de acoplamento indutivo |
| PBS | : Solução tampão fosfato-salino |
| SBF | : Solução simuladora do plasma humano |
| SEM | : Microscopia eletrônica de varrimento |
| SLCF | : Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos |
| UV-Visível | : Espectrofotometria no ultravioleta visível |
| β-TCP | : β-fosfato tricálcico |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os sistemas de libertação controlada de fármacos (SLCF) surgem como uma alternativa à administração das formas ditas convencionais (comprimidos, cápsulas, injeções), sendo uma forma de melhorar a eficácia e a segurança terapêutica dos fármacos e aumentar assim a qualidade de vida dos pacientes.

Quando administrados por uma das vias convencionais, os fármacos entram na corrente sanguínea onde a sua concentração aumenta inicialmente, atinge um máximo e em seguida declina e assim sucessivamente, consoante o número de doses administradas. Cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual se torna tóxico e abaixo da qual é ineficaz. Os SLCF visam manter a concentração do fármaco na faixa terapêutica e por um tempo prolongado, recorrendo idealmente a uma única dosagem, reduzindo assim os problemas de toxicidade e a necessidade de sucessivas administrações, o que se traduz numa melhoria considerável do conforto do paciente (Figura 1).

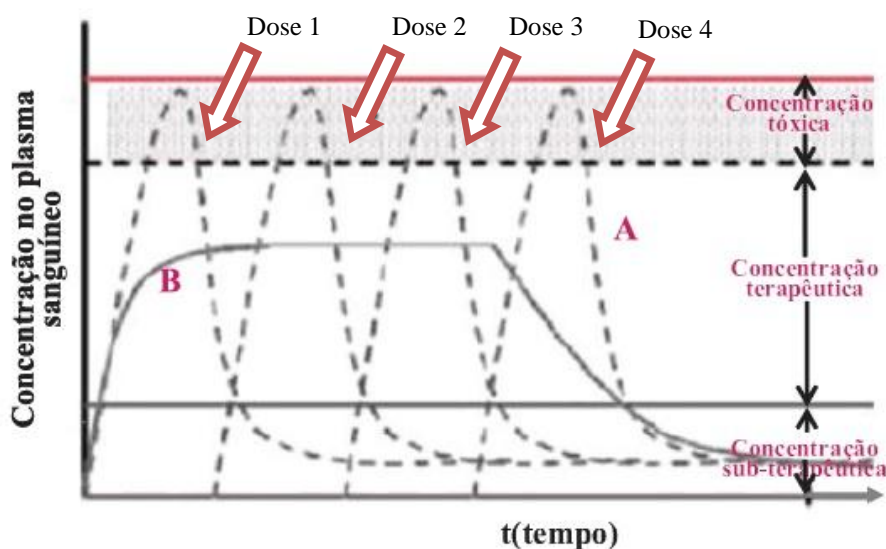


Figura 1 –Variação da concentração de fármaco no plasma sanguíneo: fármaco administrado pela via convencional (A) versus fármaco entregue por um sistema de libertação controlada (B).

Adaptado de ref. [1].

O conceito de SLCF não ficou confinado à utilização puramente terapêutica tendo invadido outras áreas designadamente a da engenharia de tecidos. Sendo um dos mais emblemáticos avanços na área da Engenharia Biomédica, os materiais de suporte (*scaffolds*) para crescimento e regeneração de tecidos poderão oferecer desempenhos

melhorados se tais materiais forem dotados da capacidade de libertar localmente e de uma forma controlada os fármacos ou moléculas com interesse local [1]. Surge assim o interesse em desenvolver *scaffolds* que sejam simultaneamente um SLCF e, temporariamente, uma matriz que auxilie na proliferação celular e deposição da matriz extracelular, com consequente troca progressiva por uma estrutura regenerada e reconstituída [2].

A engenharia de tecidos (ET) é fundamentalmente descrita como a geração de tecidos artificiais tridimensionais (3D). O seu objetivo é regenerar o tecido humano ou desenvolver substitutos baseados em células, a fim de restaurar, reconstruir ou melhorar as funções dos tecidos vivos [3, 4].

A Figura 2 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica de ET onde as células do paciente são isoladas, expandidas em meio biológico, cultivadas numa matriz/suporte (*scaffold*), e, finalmente, reinseridas no paciente [3, 4]. A técnica de ET é conseguida através da combinação de três elementos principais: biomateriais (*scaffolds*), células e moléculas bioativas.

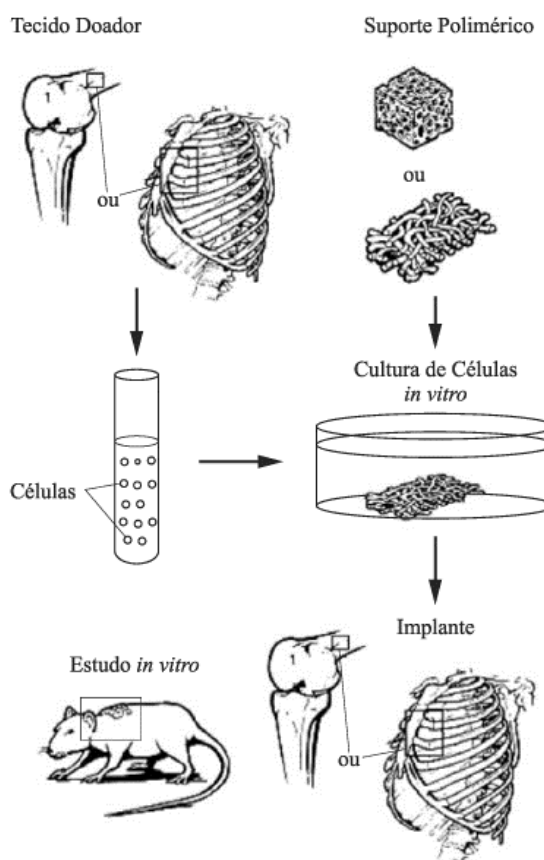


Figura 2 – Técnica da Engenharia de Tecidos.

Retirado de ref. [4].

Devido à sua condição de componente natural do tecido ósseo, a hidroxiapatite (HAp) possui boas propriedades de biocompatibilidade [5-7], biofuncionalidade [7] e osteocondução [5-7], podendo ser um dos mais auspiciosos biomateriais na fabricação de *scaffolds* para a engenharia de tecido ósseo e um excelente suporte para a liberação controlada de fármacos. Apesar de biocompatível, biofuncional e osteocondutora, a HAp apresenta um tempo de degradação muito lento. Este inconveniente pode ser superado pelo uso de composições bifásicas de hidroxiapatite e fosfato tricálcico (HAp e β -TCP) que combinam a elevada solubilidade, e por conseguinte reabsorbilidade, do β -TCP com a alta biocompatibilidade e bioatividade da HAp [8]. Estudos anteriores [7] demonstraram que *scaffolds* compósitos de quitosano (CH)/grânulos de hidroxiapatite (HAp) carregados com dexametasona (DEX), evidenciaram um perfil de liberação segundo o qual cerca de 80% da DEX é libertada ao longo de aproximadamente 30 dias, assegurando-se assim uma liberação mais lenta e prolongada do que as referidas na literatura para a DEX. Não são, no entanto, ainda conhecidos os efeitos da substituição dos grânulos de HAp por grânulos bifásicos (HAp + β -TCP) na preparação do *scaffold* compósito CH/HAp nem no seu desempenho enquanto SLCF e suporte para regeneração óssea.

O objetivo da presente tese centra-se, assim, no estudo da preparação e caracterização de *scaffolds* compósitos (quitosano)/(fosfatos de cálcio bifásicos) que combinem características adequadas para utilização como suportes para regeneração óssea e simultaneamente como sistemas de liberação controlada de fármacos. Por ser de fácil detecção através de espectrofotometria de UV-Visível ao comprimento de onda de 242nm, e por estimular a diferenciação celular [9, 10], a dexametasona (DEX) foi também escolhida como fármaco modelo na presente tese.

A presente tese está organizada em 5 capítulos. O capítulo 1 diz respeito aos interesses e objetivos do presente estudo. No capítulo 2, apresentar-se-á uma revisão bibliográfica de assuntos relevantes para a contextualização dos resultados e sua discussão. A formulação do problema será feita no capítulo 3. Os materiais e métodos de preparação serão abordados no capítulo 4. Os resultados serão analisados e discutidos no capítulo 5. Finalmente, as principais conclusões e recomendações para trabalho futuro serão sumarizadas no capítulo 6.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Osso humano

O osso é um tecido conjuntivo complexo e extremamente organizado e especializado. É importante compreender a sua estrutura bem como as suas propriedades biológicas e biomecânicas, de forma a compreender o processo de reparação óssea e definir o tipo de substituto ósseo a adotar em situações de lesão.

O tecido ósseo tem como finalidade garantir o suporte estrutural do corpo, servindo de proteção aos tecidos moles e protegendo órgãos vitais como os contidos na caixa torácica e craniana. Além disso proporciona apoio aos músculos, transformando as suas contrações em movimentos úteis, e serve também de fonte de iões cálcio e fosfato necessários a uma grande variedade de funções metabólicas [11, 12]. O tecido ósseo é formado por células e por um material intercelular constituído por fibras de colagénio calcificadas (cristais de HAp encontram-se “embutidos” nas fibrilhas de colagénio), a matriz óssea. As células que compõem o tecido ósseo denominam-se: (i) osteócitos, células que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; (ii) osteoblastos, células produtoras da parte orgânica da matriz (colagénio) e (iii) osteoclastos, células gigantes com vários núcleos, responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, participando, assim, dos processos de remodelação dos ossos [12].

Macroscopicamente um esqueleto completamente desenvolvido é constituído por 80% de osso cortical (ou compacto) e por 20% de osso esponjoso (trabecular). O osso cortical distingue-se do osso esponjoso pela orientação espacial dos seus componentes minerais e orgânicos, pelas posições características no esqueleto, sendo muito mais denso que o osso esponjoso. Os componentes minerais do osso são fosfatos de cálcio, sendo o mais importante a hidroxiapatite [9]. A Figura 3 ilustra o osso compacto e trabecular.

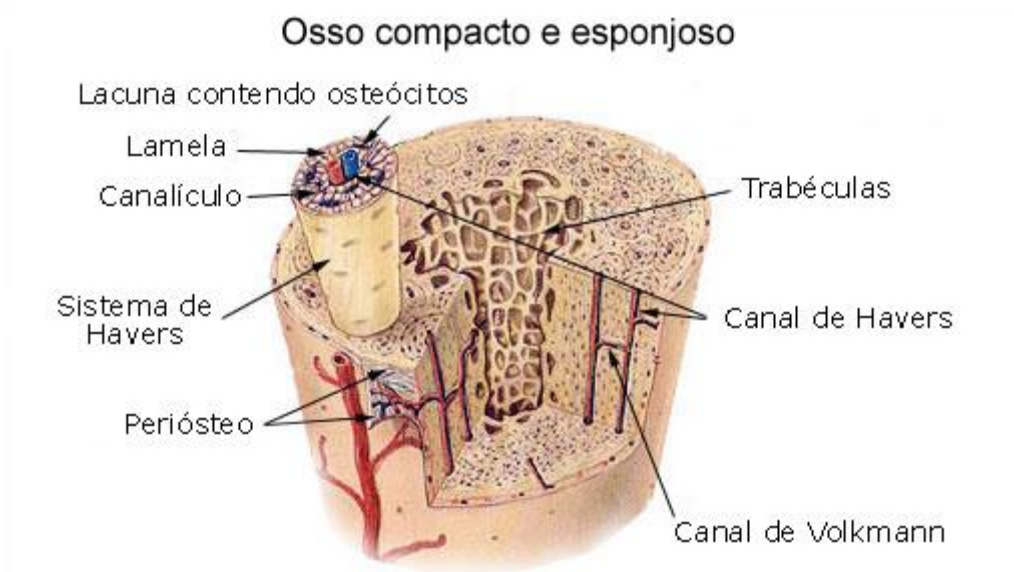


Figura 3 - Estrutura do osso compacto e osso trabecular.

Retirado de <http://www.infoescola.com/histologia/tecido-osseo/>.

O osso compacto existe na parte exterior tubular dos ossos longos e na superfície externa dos ossos pequenos e ossos chatos. Ocupa grande parte do esqueleto humano e possui alta densidade e uma baixa área de superfície específica. A densidade deste tipo de osso situa-se entre $1800\text{-}2000\text{ kg/m}^3$ [13]. As suas propriedades mecânicas são fortemente influenciadas pelo nível de mineralização, porosidade e organização da matriz sólida que por sua vez variam com a posição no esqueleto e, naturalmente, com a sua idade. O comportamento mecânico do osso compacto já foi alvo de numerosos estudos, frequentemente centrados no osso compacto da tíbia e fêmur, que revelaram um módulo de Young entre $8,7\text{ a }14,1\text{ GPa}$ e uma força de compressão de $131\text{-}224\text{ MPa}$ [14].

Ao contrário do osso compacto, o osso trabecular possui uma aparência esponjosa e uma elevada área de superfície específica. Dependendo da sua localização no corpo, a densidade aparente do osso trabecular varia entre $100\text{ e }900\text{ Kg/m}^3$. A sua força de compressão varia entre $4\text{ a }12\text{ MPa}$ e o seu módulo de Young pode ir de $0,02\text{ a }0,5\text{ GPa}$ [15-17].

Na Tabela 1 apresentam-se, sumariamente, as propriedades mecânicas e dados de porosidade do osso humano.

Tabela 1 - Resumo das propriedades mecânicas e porosidade do osso humano. Adaptada de [16]

| | Resistência à compressão (MPa) | Resistência à flexão (MPa) | Resistência à tracção (MPa) | Módulo de rigidez (GPa) | Porosidade (%) |
|-----------------------|---|---------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------|
| Osso cortical | 131-224 | 135-193 | 50-151 | 8,7-14,1 | 5-13 |
| Osso esponjoso | 4-12 | — | 1-5 | 0,05-0,5 | 30-90 |

Tem-se investigado um elevado número de materiais com o objetivo de imitar as propriedades do osso. Uma das frequentes formas de obter substitutos ósseos é produzir fosfatos de cálcio e dispersá-los em matrizes poliméricas, obtendo estruturas de suporte ou *scaffolds* compósitos

2.2. *Scaffolds* para regeneração óssea

A engenharia de tecidos ou Bioengenharia, como definida por Langer e Vancanti, constitui uma inovação na medicina regenerativa e é baseada em três elementos 1) células, 2) *scaffolds* e 3) fatores de crescimento [3].

Os *scaffolds* são estruturas artificiais capazes de suportar a formação de tecido a duas e três dimensões e permitem-nos observar comportamentos celulares condicionados pela composição do meio e pela interação célula-célula bem como a viabilidade e diferenciação celular. No entanto as estruturas a três dimensões possibilitam-nos uma realidade mais fisiológica podendo mimetizar adequadamente a matriz extracelular e serem suscetíveis a ensaios mecânicos [3]. A engenharia de tecidos assenta frequentemente numa de duas estratégias: formação de novo tecido *in vivo* e *in vitro*. A primeira consiste em implantar o *scaffold*, com ou sem células semeadas, no paciente no local onde se encontra a lesão com o objetivo de corrigir o defeito existente utilizando a capacidade de regeneração do corpo do paciente (Figura 4). A cultura de tecido novo *in vitro* (Figura 5) pressupõe também o recurso a *scaffolds* mas num ambiente controlado com características propícias ao crescimento celular (bioreatores); quando o tecido já está regenerado é implantado no paciente [6].

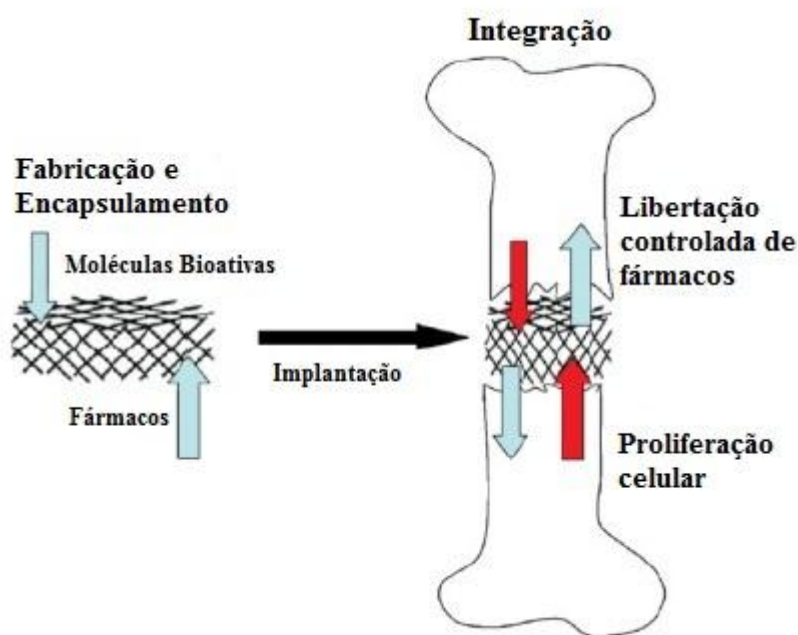


Figura 4 – Representação esquemática da implantação de um *scaffold* na zona do tecido lesado, *in vivo*. Adaptado de ref. [18].

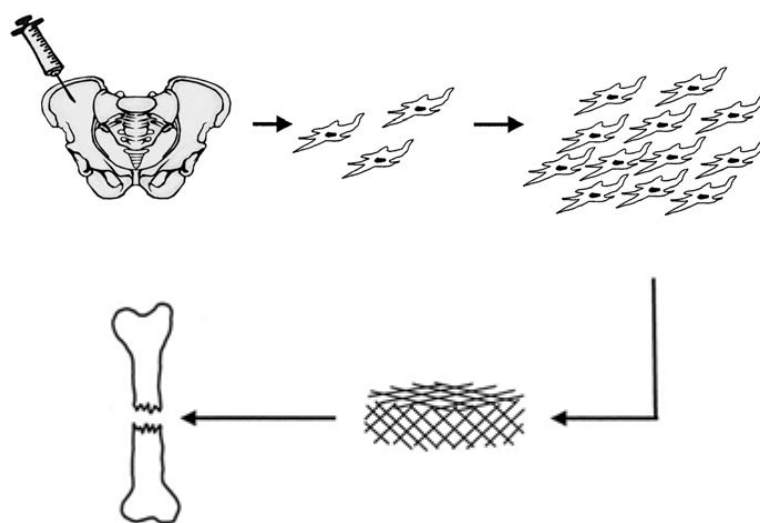


Figura 5 – Representação esquemática da formação de novo tecido *in vitro*. Retirado de ref. [18].

Cada uma destas estratégias traz as suas vantagens: o crescimento *in vivo* é benéfico devido ao crescimento ser incentivado pelo próprio corpo do paciente embora o *scaffold* fique sujeito a maiores esforços devido à presença dos tecidos envolventes que provocam maior desgaste e portanto uma degradação mais rápida, o que complica o projeto

e fabricação de *scaffolds* adequados às tensões de trabalho. No ambiente de regeneração *in vitro* o processo pode ser melhor observado e estudado [6].

A principal função de um *scaffold* é dirigir o comportamento celular, ou seja a migração, proliferação e manutenção celular e a diferenciação do fenótipo e apoptose, facilitando a detecção celular e respondendo ao ambiente através de comunicações célula-*scaffold* e célula-célula [3, 6]. O facto de possuírem tais capacidades faz deles uma parte importante na ET e medicina regenerativa [3]. O desenho e fabrico de *scaffolds* revestem-se assim de uma importância fundamental na medida em que, idealmente, devem conduzir a um suporte dentro do qual as células proliferam e são instruídas a formar um tecido ou órgão de uma maneira altamente controlada [3].

Para obtermos uma resposta biológica desejada, o *scaffold* deve idealmente possuir características tais como (1) interconetividade de poros adequada para favorecer a integração do tecido e a vascularização, (2) deve ser feito de material com biodegradabilidade e bioreabsorbilidade controlada, (3) deve possuir superfície química apropriada à adesão, proliferação e diferenciação celular, (4) deve possuir propriedades mecânicas adequadas para coincidir com as do sítio de implantação, (5) deve ser de fácil esterilização não induzindo qualquer resposta adversa e (6) deve ser fácil de fabricar nas mais variadas formas e tamanhos [2, 3, 6, 19].

2.2.1. Morfologia

Os *scaffolds* usados na regeneração óssea devem ser osteocondutivos (atuar como substrato favorável à migração celular e deposição óssea, sendo simultaneamente substituídos por novo tecido ósseo) e possuírem factores de osteoindução (que estimulam a diferenciação de células indiferenciadas em osteoblastos, os quais são responsáveis pela formação óssea) [20]. Para assegurar a ligação celular, os *scaffolds* devem possuir uma grande área superficial que pode ser conseguida através da utilização de espumas poliméricas altamente porosas [3]. A sua estrutura porosa deve ser capaz de mimetizar as ligações entre os poros que permitem a comunicação intercelular do tecido nativo [20]. A influência de diferentes arquiteturas do *scaffold* na ligação e proliferação celular está ilustrada na Figura 6.

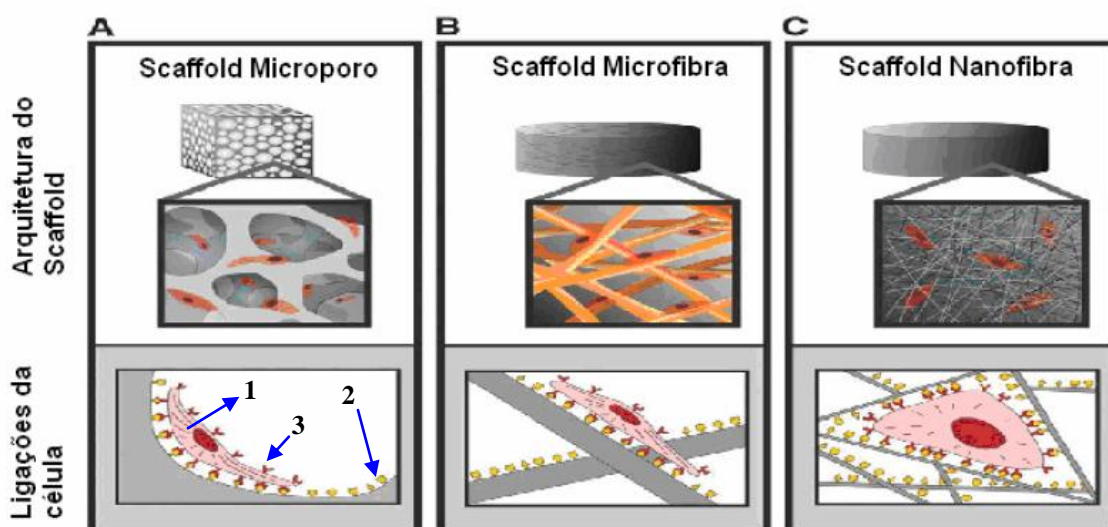


Figura 6 – Influência da arquitetura do *scaffold* na ligação e espalhamento celular. As células (1) ligam-se a sinais específicos (2) presentes nos *scaffolds* através de receptores (3) presentes na membrana celular.

Adaptado de ref [21].

Os muitos e diferentes tipos de informações codificados dentro de um ambiente extracelular combinam entre si e configuram as atividades celulares, mantendo a diferenciação dos seus respectivos tecidos. As mudanças do gradiente de sinalização por essa codificação promovem sinais específicos (Figura 6 2) e os receptores celulares (Figura 6 3) distribuídos pela membrana celular percebem esse sinal e respondem com um comportamento direcionado. Pela Figura 6 pode observar-se que os receptores celulares serão ativados de modo diferente nas estruturas A, B e C e assim a resposta dessa célula também será diferente, sendo os *scaffolds* nanofibrosos os que apresentam ligação celular mais adequada uma vez que apresentam maior área de superfície, útil para a adsorção celular, e mais locais de ligação às células.

Avaliações *in vitro* revelam que para se conseguir o crescimento de uma grande quantidade de tecido (tipicamente mais do que 1 mm), é necessário promover o crescimento celular dentro do *scaffold*. Isto apenas pode ser alcançado quando os nutrientes são entregues às células e os produtos residuais são expulsos. A vascularização do *scaffold* é a chave para o sucesso desta estratégia. O crescimento celular organizado requer uma otimização dos *scaffolds* por forma a maximizar a utilização celular, minimizar o tempo na suspensão para promover a ancoragem e para não haver cisalhamento das células mais sensíveis e permitir espacialmente uma regeneração do tecido uniforme [22].

Estes requisitos podem ser satisfeitos usando *scaffolds* altamente porosos e com características internas adequadas.

A porosidade, tamanho e estrutura de poro são fatores com grande importância no transporte de nutrientes para células transplantadas e regeneradas. Segundo a união internacional de química pura e aplicada (IUPAC) os poros podem ser classificados como micro, meso e macroporos, quando as suas dimensões são menores do que 2nm, situadas entre 2 e 50 nm ou superiores a 50 nm, respetivamente [20]. A presença de macroporos é desejável em *scaffolds* com elevada razão (área/volume) desde que o tamanho dos macroporos seja maior do que o diâmetro da célula em suspensão (tipicamente de 10µm). Existe uma falta de consenso sobre o tamanho ideal dos macroporos para o máximo crescimento de tecido e/ou crescimento ótimo das células mas alguns autores defendem que o máximo crescimento é atingido com macroporos de tamanhos variando entre 200 a 450µm enquanto outros apontam para gamas de 100 a 150µm ou de 100 a 350µm [23, 24]. A interconetividade entre os macroporos é altamente desejável uma vez que uma estrutura de poros em rede interligada aumenta as taxas de difusão de fora para o centro do *scaffold* e facilita a vascularização, melhorando assim o transporte de nutrientes e oxigénio e facilitando a remoção de resíduos. A presença de microporos também é importante pois pode possibilitar a inclusão de agentes reguladores e/ou fármacos no material de base dos *scaffolds* auxiliando a regeneração de tecido. A microporosidade tem elevada influência na taxa de degradação do *scaffold* [23, 24].

Abordam-se seguidamente os conceitos de biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade necessários para o desempenho do *scaffold* como substituto ósseo.

2.2.2. Biocompatibilidade

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material existir num ambiente *in vivo* durante um período de tempo aceitável, sem qualquer efeito prejudicial para o hospedeiro [25]. As propriedades dos materiais que são relevantes para efeitos de biocompatibilidade incluem a trombogenicidade, a toxicidade e a resistência à adesão celular [25]. A biocompatibilidade é uma característica que o material deve possuir aquando da sua implantação mas também durante a sua vida útil como implante, isto é, os produtos da sua degradação também devem ser biocompatíveis [26].

2.2.3. Bioatividade

Alguns cerâmicos possuem a particularidade de se ligarem quimicamente ao osso [27]. A descoberta desta capacidade de ligação, por reação superficial, introduziu um novo conceito no campo dos biomateriais - a bioatividade - e veio contribuir para a concretização de um importante requisito para o sucesso clínico de um implante: o estabelecimento de uma interface estável entre o implante e o tecido ósseo. Esta ligação baseia-se na capacidade que estes biomateriais têm de induzir a formação de uma camada superficial de apatite [28, 29].

2.2.4. Biodegradabilidade

O material usado na produção dos *scaffolds* deve poder degradar-se *in vivo* para permitir que o tecido invada progressivamente o *scaffold* à medida que ele regenera. A taxa de degradação deverá corresponder o melhor possível à taxa de regeneração do tecido para que o *scaffold* esteja totalmente degradado quando o osso estiver totalmente regenerado [26].

A biodegradação pode classificar-se como hidrolítica ou enzimática. A maior parte dos polímeros naturais sofre degradação enzimática enquanto que os polímeros sintéticos sofrem principalmente degradação hidrolítica [30]. Adicionalmente, o material é classificado como bioreabsorvível se os produtos da sua degradação puderem ser eliminados pelo corpo [31].

Os fatores que tendem a aumentar a velocidade ou extensão da biodegradação são diversos, tais como, o aumento da porosidade, reduções no tamanho da cristalite, aumento da área de superfície e aumento do número de imperfeições cristalinas [32].

A biodegradação ou bioreabsorção do material de implante resulta de alterações de propriedades físico-químicas, podendo ser considerada como uma combinação dos seguintes processos [32]: (a) físicos como abrasão, fratura, e desintegração e (b) químicos como dissolução, aumento da concentração local de cálcio e fosfato conduzindo à formação de precipitados superficiais (fosfato de cálcio amorfo, fosfato dicálcico dihidratado, fosfato octacálcico e hidroxiapatite não estequiométrica semelhante à apatite óssea, entre outros) e (c) biológicos como redução do pH provocada por atividades celulares e fagocitárias (mediadas por macrófagos e osteoclastos), resultando na dissolução do implante.

2.3. *Scaffolds* e a escolha de materiais

A vantagem de usar cerâmicos de fosfatos de cálcio na produção de *scaffolds* como SLCF, deve-se ao facto daqueles serem biocompatíveis, osteocondutores e com elevada resistência mecânica. A HAp é um dos fosfatos de cálcio mais usados uma vez que a sua composição química é semelhante à parte mineral do osso humano [6, 7]. No entanto estes cerâmicos apresentam algumas desvantagens, uma vez que são frágeis e se degradam lentamente. Uma forma de ultrapassar estes inconvenientes consiste em associá-los a polímeros biodegradáveis na formulação do *scaffold*, pois embora apresentem baixa rigidez e resistência à compressão, degradam-se facilmente [7]. A combinação (polímero biodegradável/cerâmico de HAp) apresenta-se assim como uma formulação mais promissora para a produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos.

Os primeiros estudos sobre a utilização de materiais cerâmicos como biomateriais começaram com Albee, em 1930, utilizando cerâmicos de fosfato tricálcico para reparar um defeito ósseo e formação de novo osso. Cinquenta anos mais tarde começaram a ser utilizados diferentes tipos de fosfatos de cálcio como materiais implantáveis para aplicação em medicina e odontologia. Em 1974 foi publicada a primeira aplicação odontológica do β -fosfato tricálcico (β -TCP) no tratamento de doenças periodontais, seguindo-se, em 1975, o trabalho de Nery *et al* com a introdução do conceito de porosidade como característica importante neste tipo de biocerâmicos [5]. Atualmente a HAp é amplamente utilizada na elaboração de implantes ósseos devido ao facto de ser quimicamente estável, permitindo assim um bom controlo do seu comportamento *in vivo* [33, 34].

Quanto aos polímeros biodegradáveis podem ser igualmente usados polímeros naturais e polímeros sintéticos. Os engenheiros de tecidos preferem os polímeros naturais uma vez que são encontrados nas estruturas de seres vivos e apresentam semelhanças biológicas e químicas com os tecidos vivos [20].

2.3.1. Polímeros

A utilização de materiais poliméricos biodegradáveis em ET reside no facto destes materiais satisfazerem muitos dos requisitos técnicos e biológicos necessários para tal aplicação [37]. Como referido anteriormente, estes polímeros podem ser de origem sintética ou natural. Relativamente à maioria dos polímeros sintéticos, quando colocados em contacto com o organismo, a sua degradação, tanto *in vivo* como *in vitro*, liberta espécies químicas prejudiciais ao organismo. Por exemplo, durante a degradação do ácido

poli-L-lático (PLLA) ocorre libertação de ácido lático que causa a diminuição do pH, acelerando a taxa de degradação e assim prejudicando a adesão celular [3]. Segundo alguns autores, a fraca adesão celular deste polímero está também relacionada ao facto deste ser hidrofóbico [35]. Assim, os polímeros de origem natural, nomeadamente proteínas e polissacarídeos, têm sido amplamente utilizados como alternativa aos polímeros sintéticos, em ET e como transportadores de fármacos [36-38]. Na secção seguinte abordar-se-á com mais pormenor um polímero natural, o quitosano, por ser o polímero seleccionado para o presente estudo.

2.3.3.1. Quitosano

O quitosano (CH) é um polissacarídeo derivado da quitina por desacetilação (aumento da percentagem de grupos amina livres) cujas estruturas moleculares se apresentam na Figura 7. Depois da celulose, é o composto orgânico mais abundante na natureza e constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos.

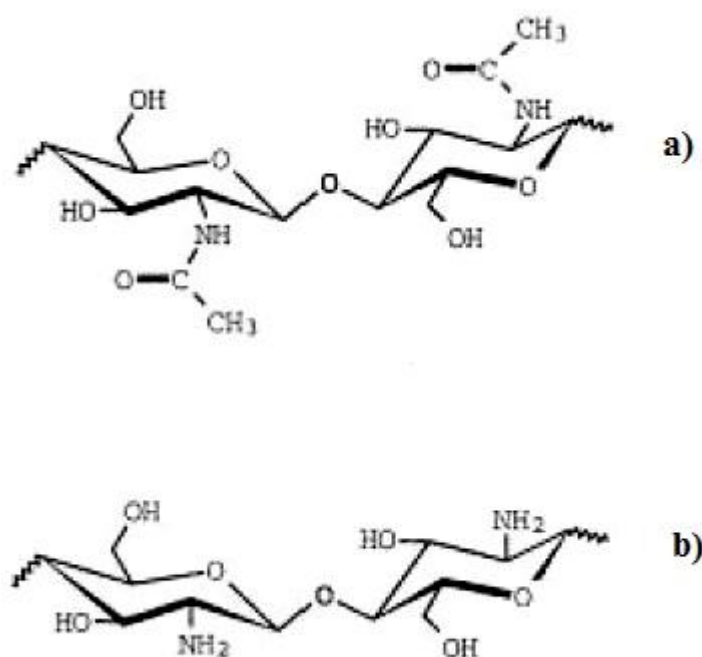


Figura 7 - Estrutura molecular a) da quitina a) e b) do quitosano.
Retirado de ref.[39].

Além de natural, tem baixo custo, é renovável e biodegradável, possuindo grande importância económica e ambiental [40-43]. Uma outra característica muito importante do quitosano é a sua solubilidade em água levemente acidificada ($\text{pH} < 6$). Tal solubilidade deve-se à protonação dos grupos amina do polímero quando em meio ácido. Esta protonação ocorre devido à facilidade do átomo de azoto do grupo amina em partilhar o par de eletrões desemparelhado com iões carregados positivamente [44]. Devido ao seu carácter catiónico tem facilidade em ligar-se a moléculas ou a superfícies com carga negativa, desenvolvendo assim uma rápida interação com os tecidos humanos.

O CH é também um polímero semicristalino cuja cristalinidade depende do seu grau de acetilação que é controlável. A cristalinidade do quitosano reflete-se na taxa de degradação *in vivo*, verificando-se que, quanto maior for a cristalinidade, menor será a tendência para sofrer degradação. Tal facto deve-se à dificuldade das enzimas hidrolíticas em penetrar na estrutura ordenada do polímero cristalino [45]. A sua maior aplicação é na área biomédica nomeadamente na libertação controlada de fármacos. Potenciais aplicações como em suturas cirúrgicas, implantes dentários e lentes de contato estão a ser alvo de estudo [9, 10, 40, 46]. No entanto, existem atualmente algumas dificuldades na aplicação do quitosano em *scaffolds*, devido à sua baixa resistência mecânica. Porém, o quitosano pode ser facilmente modificado ou combinado com outros materiais por forma a aumentar essa resistência [3]. Uma das modificações pode ser conseguida com a ajuda de um agente de reticulação. Este permite a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas formando uma estrutura tridimensional reticulada. A reticulação estabelece assim ligações químicas fortes entre as macromoléculas que conferem estabilidade à estrutura dos *scaffolds* [3].

O glutaraldeído (GA), cuja estrutura molecular e tridimensional se ilustra na Figura 8, é um agente de reticulação química que intervém na reação que ocorre entre dois grupos amina. O CH possui grupos amina, por isso pode ser reticulado com este tipo de agente. O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos NH_2 está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amina livres dos compostos originando a formação de uma base de *Schiff* ($\text{C}=\text{N}$). Da interação com grupo amina sugerem-se três estruturas, 1) existência da formação de apenas uma base de *Schiff* com um dos grupos aldeídos do glutaraldeído, o outro grupo permanece livre e é utilizado para uma reação subsequente, 2) os dois grupos aldeído de uma única molécula de glutaraldeído

reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada e 3) a ligação cruzada é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído tornando a estrutura mais rígida [47]. Apesar do glutaraldeído ser o agente de reticulação mais usado em ET, apresenta níveis de citotoxicidade elevados se usado em concentração acima de 0,6% [48] (em relação à massa de polímero) e reatividade limitada com grupos acetil. Assim é necessário controlar a concentração a utilizar para que não ocorram reações adversas.

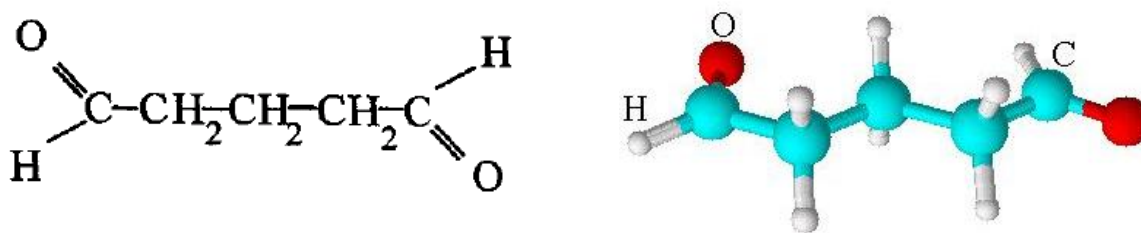


Figura 8 – Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído.

Retirado de ref. [49].

Hsieh *et al* [50] utilizaram o glutaraldeído para reforçar as propriedades mecânicas de *scaffolds* de quitosano averiguando que a resistência à compressão aumenta com o aumento da quantidade do agente de reticulação. A utilização do GA não se restringe apenas à melhoria das propriedades mecânicas dos *scaffolds*. Estudos em ratinhos de laboratório [51] mostraram também que o GA pode ser utilizado para retardar a biodegradação do quitosano de uma maneira significativa. Jameela *et al* verificaram que *scaffolds* de quitosano puro não reticulados apresentam um tempo de degradação *in vivo* de dois meses ao contrário dos modificados com glutaraldeído, que ao fim de um ano ainda não se apresentavam completamente biodegradados sem que tenham ocorrido reações adversas nos tecidos. Outros resultados de estudos *in vivo* permitiram identificar a biocompatibilidade de *scaffolds* de CH. Malafaya *et al* [52] produziram *scaffolds* por agregação de partículas de quitosano e implantaram-nos na zona lombar paravertebral de ratinhos de laboratório. Os *scaffolds* obtidos apresentaram uma interconetividade de poros elevada (~95%) e após o período pós-operatório não foram detetadas complicações cirúrgicas em qualquer um dos ratinhos. Uma caracterização morfológica diferente dos implantes, após diferentes períodos de implantação, mostrou um crescimento de tecido muscular no interior dos *scaffolds* de quitosano, como se ilustra na Figura 9.

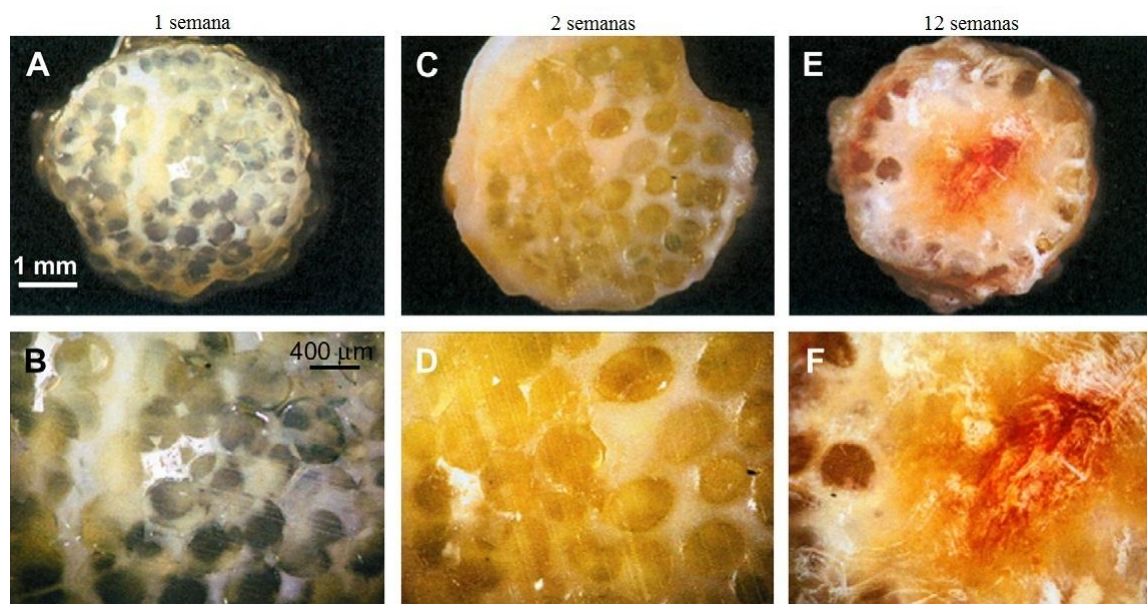


Figura 9 – Micrografias de SEM de *scaffolds* de quitosano após A) e B) 1 semana, C) e D) duas semanas e E) e F) 12 semanas de implantação em ratinhos de laboratório verificando-se a formação de tecido hospedeiro entre os poros ao longo do tempo.

Retirado de ref. [52].

O crescimento de tecido tornou-se mais pronunciado com o aumento do período de implantação, o que também foi confirmado por micro-CT. Na Figura 10 é possível identificar, pelas setas, o crescimento do tecido hospedeiro dentro dos poros do *scaffold* de quitosano.

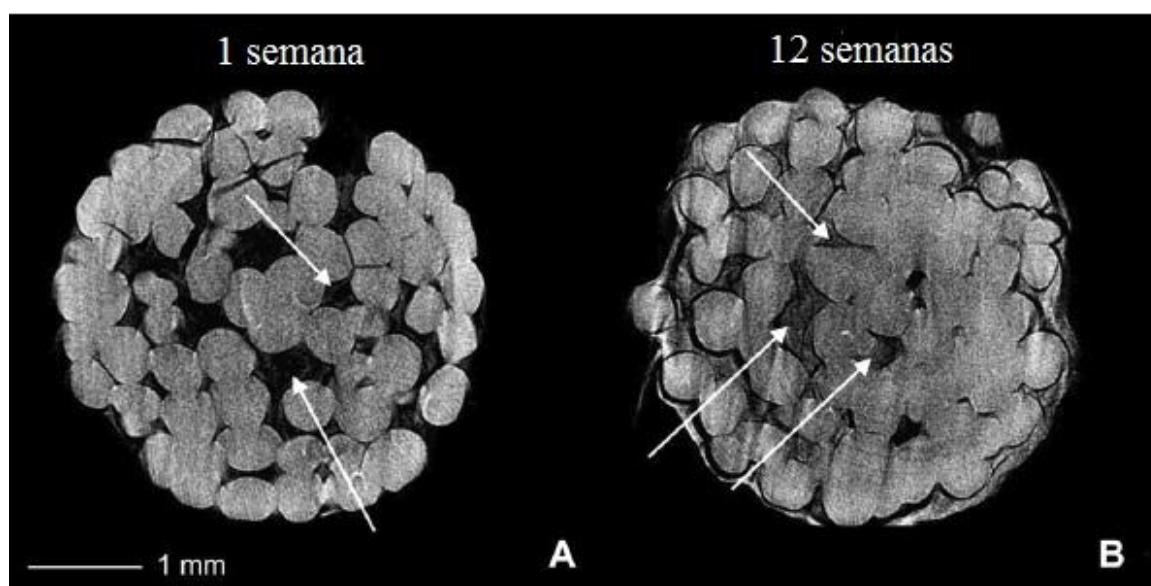


Figura 10 - Micrografias, obtidas por micro-CT, de *scaffolds* de quitosano após A) 1 semana e B) 12 semanas de implantação em ratinhos de laboratório.

Retirado de ref. [52].

Embora o quitosano seja biocompatível e desenvolva uma boa interação com os tecidos, a sua utilização em aplicações biomédicas torna-se limitada pela ausência de bioatividade. No entanto estudos recentes [53] com *scaffolds* CH/poli(D,L-lático-co-glicólico) demonstraram a formação de camadas apatíticas após 28 dias de imersão em soluções simuladoras do plasma humano (SBF). A Figura 11 mostra as estruturas típicas de hidroxiapatite que se aglomeram à medida que crescem para formar uma camada apatítica uniforme contínua.

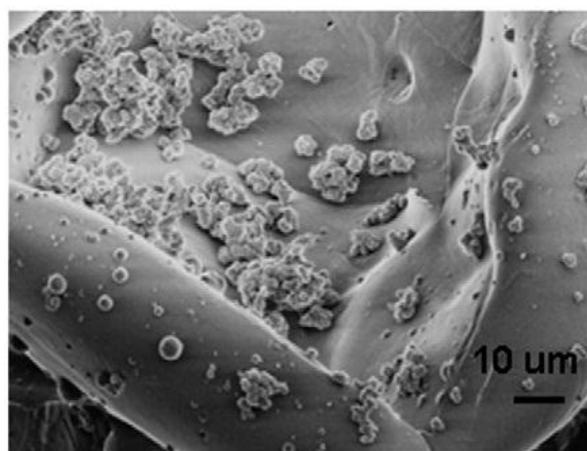


Figura 11 - Formação da camada apatítica em *scaffolds* de CH/poli(D,L-lático-co-glicólico) após 28 dias de imersão em SBF.

Retirado de ref. [53]

Outra forma de induzir bioatividade em *scaffolds* de quitosano é incorporar-lhe fosfatos de cálcio [8]. São por isso várias as referências à associação do quitosano a fosfatos de cálcio para utilização em *scaffolds* para engenharia de tecidos [7, 34, 42].

2.3.2. Cerâmicos

2.3.2.1. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp), é o componente maioritário (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos sendo a sua razão Ca/P (fase estequiométrica) igual a 1,67 [54]. É solúvel em meios ácidos, fracamente solúvel em água destilada e insolúvel em meios alcalinos. A sua taxa de degradação está dependente da porosidade, do tamanho do grão, da superfície específica e da cristalinidade, designadamente dos defeitos cristalinos e tamanho das cristalites [55].

A HAp é um dos materiais mais biocompatíveis que favorece o crescimento ósseo nos locais em que se encontra (osteocondutora), estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo (bioativa) e permitindo a proliferação de células ósseas [54]. Estas propriedades tornam a HAp um substituto natural do osso humano em implantes e próteses, e explicam o grande interesse na sua produção [5, 56]. Adicionalmente, a elevada capacidade de adsorver moléculas faz da HAp um excelente suporte para a libertação controlada de fármacos [5]. No entanto, apresenta a desvantagem de se degradar lentamente o que pode ser uma desvantagem em aplicações para regeneração óssea.

2.3.2.2. β -TCP

A hidroxiapatite não estequiométrica quando é sujeita a temperaturas elevadas (acima de 1125°C) [57] pode decompor-se e transformar-se em outras fases, como por exemplo em fosfato tricálcico (α -TCP e β -TCP). A fase β -TCP forma-se a temperaturas mais baixas do que a fase α -TCP [58]. As fases α e β do fosfato de tricálcico têm a mesma composição química mas estruturas cristalinas diferentes. A HAp possui uma estrutura cristalina hexagonal, o β -TCP tem uma estrutura romboédrica e o α -TCP ortorrômbica [57, 59]. Estas diferentes estruturas justificam que as fases α -TCP e β -TCP tenham densidades diferentes da da HAp, 2,86 g/cm³ e 3,07g/cm³ respetivamente [58].

O β -TCP é um fosfato de cálcio particularmente interessante na área da medicina devido à sua resposta biológica, em particular a capacidade de estimular a proliferação de células uma vez que é bastante bioativo. Além disso, apresenta maior solubilidade do que a HAp, degradando-se mais rapidamente do que esta. Apesar de ser um material estável à temperatura ambiente, a formação deste composto em ambientes fisiológicos não foi até à data reportada. No entanto, o corpo humano possui a capacidade de formar um composto com composição semelhante, a whitlockite, que pode ser encontrado na pedra dos dentes, na cárie dentária e nas cartilagens com artrites [58, 60, 61].

A utilização de fosfatos de cálcio também é vantajosa para a melhoria das propriedades mecânicas, além de propiciarem o crescimento das células ósseas e promoverem a ligação com o tecido na vizinhança do implante. Zhang *et al* foram capazes de melhorar o módulo de Young do quitosano de 0,967 para 2,191MPa e a tensão de cedência de 0,109 para 0,208 com a inclusão do β -TCP no quitosano [62].

Apesar das suas interessantes propriedades, não têm sido reportados estudos com *scaffolds* de β -TCP para aplicações em regeneração óssea e simultaneamente em libertação controlada de fármacos.

2.3.2.3. Composições bifásicas

Devido às limitações próprias dos vários tipos de biomateriais tem vindo a ser investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de *scaffolds*. Esta combinação tem como objetivo melhorar as propriedades mecânicas e a taxa de degradação dos *scaffolds* produzidos.

Os fosfatos de cálcio bifásicos (BCP) são misturas de HAp e β -TCP que são bioativas, biodegradáveis (devido à maior solubilidade do β -TCP relativamente à HAp) e também biocompatíveis com vários tipos e formas de tecidos (ósseo, cartilaginoso e muscular). O mecanismo de bioatividade dos BCP envolve a dissolução do β -TCP seguida de reprecipitação de hidroxiapatite carbonatada [2]. Observa-se, além disso, uma outra propriedade do BCP, a osteocondutividade, ou seja, a propriedade de promover o crescimento do osso ao redor do implante, num curto espaço de tempo, e que é apontada como uma das principais propriedades dos implantes que contêm BCP [2]. A utilização de cerâmicos bifásicos (HAp e β -TCP) na preparação de *scaffolds* poderá ser vantajosa para controlar a degradabilidade do *scaffold* uma vez que o β -TCP é mais solúvel do que a HAp e consequentemente mais facilmente reabsorvido.

2.4. Métodos de preparação de *scaffolds*

Com o objetivo de satisfazer os requisitos necessários às suas funções, os *scaffolds* devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende reparar (tecidos moles ou duros), mas esses requisitos básicos juntamente com as exigências geométricas tornam a fabricação do *scaffold* num processo complexo que exige conhecimentos sobre as características dos materiais. Assim a seleção do processo de fabrico adequado terá que ser baseada nas características do tecido a regenerar, nas do material a utilizar e na complexidade do *design* do *scaffold* [63, 64].

Têm sido desenvolvidas várias técnicas de fabricação de estruturas porosas 3D, tal como se sumariza na Tabela 2, de modo a melhorar a função e estrutura dos *scaffolds*.

Tabela 2 – Exemplos de algumas técnicas de fabricação de *scaffolds*^[19].

| Técnica | Vantagem | Desvantagem |
|--|--|---|
| Evaporação de solvente/lixiviação de solvente | Fácil controlo de porosidade, de tamanho de poro e de cristalinidade | Propriedades mecânicas limitadas, resíduos de solvente e de porogénios |
| Lixiviação de porogénios | Bom controlo de porosidade e geometria do poro | Interconetividade e tamanho de poros inadequada |
| <i>Gas foaming</i> | Isento de solventes orgânicos nocivos | Propriedades mecânicas inadequadas e interconetividade de poros inadequada |
| <i>Self Assembly</i> | Fácil controlo da porosidade, diâmetro das fibras e tamanho do poro | Materiais caros e complexidade de fabrico |
| <i>Electrospinning</i> | Bom controlo da porosidade, diâmetro das fibras e tamanho do poro | Propriedades mecânicas limitadas e o tamanho de poro diminui com a espessura da fibra |
| Prototipagem rápida | Excelente controlo de geometria e porosidade. | Equipamento caro, limitado a certos tipos de polímeros. |
| <i>Fiber mesh</i> | Área superficial elevada para a ligação celular, difusão rápida de nutrientes. | Ausência de estabilidade estrutural |

Na Figura 12 ilustram-se *scaffolds* produzidos por algumas destas técnicas.

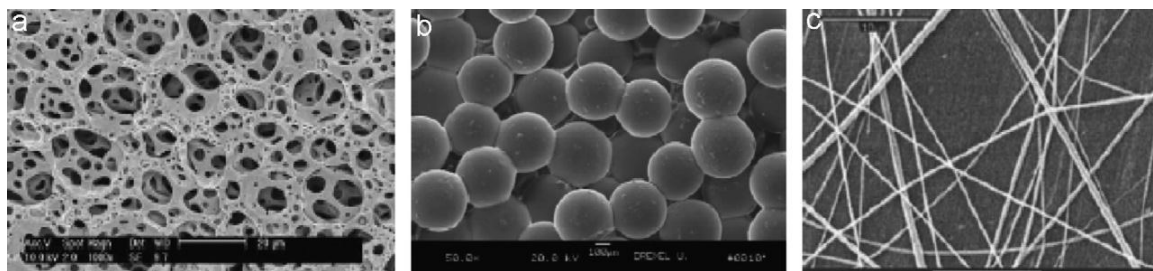


Figura 12 - Scaffolds porosos desenvolvidos por a) *gas foaming*, b) sinterização de microesferas e c) *electrospinning*.

Retirado de ref. [30].

Na secção seguinte abordar-se-ão, mais detalhadamente, a separação de fase sólido/líquido (congelamento e liofilização) uma vez que foi a técnica utilizada na produção dos *scaffolds* da presente tese.

2.4.1. Separação de fase sólido/líquido

A técnica de separação de fase usa o facto de um sistema homogéneo, tal como uma solução polimérica, poder tornar-se termodinamicamente instável e evoluir para uma separação de fases por forma a reduzir a energia livre do sistema [65]. No caso de soluções poliméricas obtidas por dissolução do polímero num solvente (no caso do presente trabalho o quitosano é dissolvido numa solução aquosa de ácido acético), a separação de fases é induzida por congelamento. Posteriormente o solvente é removido, tanto por liofilização como por extração de solvente, e no espaço ocupado inicialmente pelo solvente formam-se poros.

A arquitetura do *scaffold* (interconetividade e distribuição de tamanho do poro) pode ser controlada pela manipulação das condições experimentais da separação de fase designadamente as características químicas da solução de polímero e as condições de congelamento [66]. Estudos recentes [7] mostraram que o tamanho e morfologia de poro dos *scaffolds* são condicionados pelo pH das suspensões e pela temperatura de congelamento das soluções poliméricas. No mesmo estudo foram preparadas soluções de CH a diferentes valores de pH (pH=2 e pH=5) as quais foram congeladas a três temperaturas diferentes antes de serem liofilizadas ($T=-196^{\circ}\text{C}$, $T=-15^{\circ}\text{C}$ e $T=0^{\circ}\text{C}$). O valor de pH mais elevado (pH=5) e a temperatura de congelamento mais elevada ($T=0^{\circ}\text{C}$) foram

as condições que mais favoreceram o crescimento de cristais de gelo e por conseguinte a formação de poros de maior dimensão. A variação da taxa de congelamento também influencia a morfologia do *scaffold*, mostrando que uma taxa de congelamento rápida produz poros pequenos [19, 67].

Ma e Zhang [68] também fabricaram um *scaffold* altamente poroso com uma matriz orientada de microtubos usando a técnica de separação de fase modificada, ou seja, realizada com um gradiente de temperatura uniaxial. Para atingir este gradiente de temperatura direcional, o copo na qual foi colocada a solução polimérica foi coberto com uma camada de material isolante térmico, para reduzir a transferência de calor através da parede lateral do copo, e fixado no topo de um bloco de metal, para aumentar a condução de calor ao longo da direção longitudinal. Esta técnica também foi usada por para fabricar *scaffolds* fibrosos [69]. No entanto quando se usam solventes orgânicos para criar poros dentro dos *scaffolds* e como a remoção do solvente não é totalmente completa, os solventes tornam-se uma potencial fonte de citotoxicidade para as células. Porém já existem técnicas de elevada pressão de gás CO₂ [9, 70], como o método do fluido supercrítico, que evitam o uso de solventes tóxicos na fabricação do *scaffold*. Nesta técnica o polímero é exposto ao CO₂ que o plastifica devido à redução da temperatura de transição vítrea ou do ponto de fusão. Acima de uma certa temperatura (31°C) e pressão (73,8bar), o CO₂ passa para um estado intermediário entre o líquido e o gasoso: torna-se “supercrítico”, podendo então agir como solvente. O CO₂ em estado supercrítico pode dissolver ou incorporar a maioria das moléculas orgânicas.

2.4.2. Liofilização

A técnica de liofilização é baseada no princípio da sublimação e usada para fabricar *scaffolds* porosos. Como descrito anteriormente, numa etapa inicial o polímero é dissolvido num solvente para formar uma solução polimérica com a concentração desejada. Em seguida, a solução é congelada e posteriormente o solvente sólido, já separado do soluto (polímero), é removido por liofilização sob vácuo de modo a serem produzidas matrizes com elevada porosidade e interconetividade.

Após a liofilização, os *scaffolds* tendem a apresentar um comportamento higroscópico: a adsorção da humidade ambiente pode originar uma alteração da estrutura porosa, ou seja, os poros do *scaffold* fecham parcialmente dando lugar a uma estrutura mais compacta. Para evitar a captação de humidade por parte dos *scaffolds* é necessário

recorrer a tratamentos da superfície. No caso dos *scaffolds* de CH, como não se dissolvem em etanol, alguns autores recorrem ao tratamento em etanol [45, 50] como forma de minimizar a afinidade da superfície para a humidade atmosférica. O *scaffold* de quitosano resultante da liofilização contém iões acetato ligados quimicamente aos grupos amina. São, na verdade, os iões acetato que conferem a higroscopicidade ao *scaffold*. Para evitar esse facto, deve proceder-se à recuperação do quitosano original, isto é, do quitosano livre de grupos acetato pelo tratamento em etanol.

Hsieh *et al* [50] investigaram a influência de três variáveis na fabricação de *scaffolds* de quitosano porosos. Utilizaram quatro temperaturas de congelamento (-20, -40, -60 e -80°C), diferentes concentrações de ácido acético (1-2M) e diferentes concentrações de etanol (0, 50 e 95%) verificando que a temperatura de congelamento mais elevada (-20°C) e a elevada concentração de ácido acético (2M) melhoram as propriedades mecânicas dos *scaffolds* enquanto que uma concentração elevada de etanol diminui as mesmas.

A principal vantagem da liofilização reside no facto de não necessitar de altas temperaturas nem de distintas etapas de lixiviação. No entanto é um processo demorado e o tamanho dos poros é pequeno (normalmente <500µm) [71].

2.5. Sistemas de libertação controlada de fármacos

Muitas das substâncias ativas prescritas atualmente têm uma ação terapêutica de curta duração, o que implica frequentemente a toma repetida da dose por parte do paciente, ao longo de intervalos de tempo mais ou menos longos. Este facto é a causa de grandes variações de concentração do fármaco na corrente sanguínea, situação que pode originar períodos em que ocorre uma concentração do fármaco subterapêutica e outros em que os limiares de toxicidade do fármaco são ultrapassados. Tendo em conta estes factos, podemos afirmar que apenas durante um curto período de tempo é obtida a concentração pretendida de fármaco. Para obstar a esta situação, o formulador pode optar por modular a libertação do fármaco a partir do sistema farmacêutico, por forma a que as concentrações do fármaco se mantenham nos limites terapêuticos durante o espaço de tempo pretendido [6, 72].

No caso de matrizes poliméricas libertadoras de fármacos, o fármaco é dissolvido ou disperso através de uma fase polimérica sólida [72] que permanece no organismo por um período de tempo longo.

Uma grande variedade de novos materiais tem sido desenvolvida para utilização em matrizes de liberação controlada de fármacos, particularmente polímeros biodegradáveis que se dissolvem lentamente. Mediante a concepção cuidadosa do material e do dispositivo, é possível fabricar SLCF nos quais a taxa de degradação e dissolução do polímero controla a taxa de liberação do fármaco, proporcionando um novo parâmetro para controlar a taxa de liberação do fármaco disperso ou dissolvido [72].

2.5.1. *Scaffolds* como SLCF

Como já foi referido anteriormente os *scaffolds* para ET ósseo têm um papel fundamental, sendo-lhes exigidos vários requisitos tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades químicas de superfície adequadas para a adesão celular, boas propriedades mecânicas, tamanho e morfologia dos poros apropriada, serem de fácil esterilização e facilmente processáveis em variadas geometrias tridimensionais para tentar replicar as funções das matrizes extracelulares e assim formar novo osso [2, 6].

Para que ocorra regeneração tecidual é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo que consigam aderir, crescer e atravessar todo o material e que estejam presentes fatores (fármacos por exemplo) que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos [73]. Desta forma, quando considerado como SLCF, o *scaffold* deve idealmente possuir alguns requisitos tais como afinidade para com o fármaco sem que ocorra a destruição tanto do *scaffold* como do fármaco, capacidade de suportar quantidades de fármacos desejadas, porosidade adequada e ser capaz de controlar a cinética de liberação dos fatores de crescimento durante o período de formação de novo osso [74].

São várias as referências encontradas na literatura alusivas a *scaffolds* como SLCF. Como reportado na secção 2.3.1, o glutaraldeído é utilizado principalmente para melhorar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. No entanto Jameela *et al* [75] também corroboraram a sua utilidade em SLCF: enquanto os *scaffolds* com menos teor de agente de reticulação libertaram 100% de fármaco em 24 horas, os *scaffolds* com elevada quantidade de agente de reticulação libertaram apenas 25% do fármaco ao longo de 36 dias.

2.5.2. Formas de imobilização do fármaco

Segundo alguns autores a imobilização do fármaco em matrizes poliméricas pode ser feita fisicamente, quando o fármaco é disperso na matriz polimérica durante a preparação da mesma, quimicamente, quando se utilizam ligantes para aprisionar as

moléculas do fármaco à matriz, ou por encapsulamento do fármaco em micro ou nano-esferas e posterior dissolução na matriz formando um sistema hierarquizado [76]. O uso de sistemas hierárquicos confere uma maior proteção para a degradação da matriz polimérica e um melhor controle da cinética de liberação [76]. Na Figura 13 estão representadas formas de imobilização do fármaco em matrizes poliméricas transportadoras.

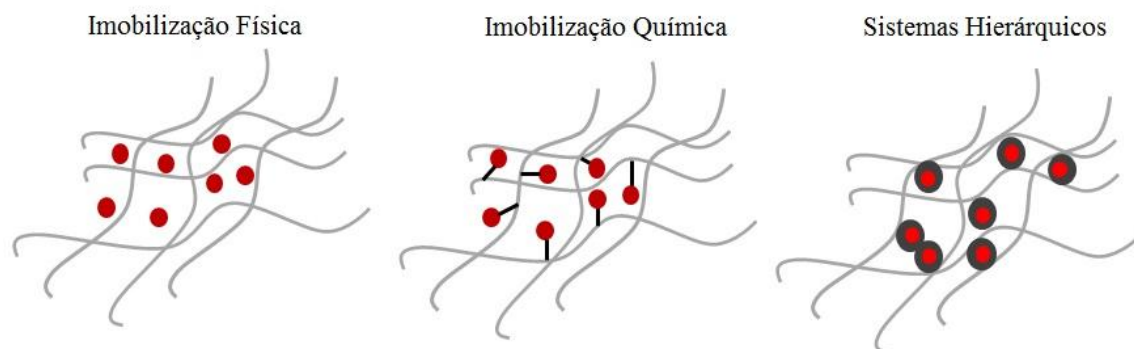


Figura 13 - Formas de imobilização do fármaco em matrizes transportadoras.
Retirado de ref. [76].

Na presente tese foram preparados grânulos de CaP carregados com fármaco por atomização e posteriormente foram dispersos numa matriz polimérica de CH formando um sistema hierárquico. A preparação grânulos a partir de pós muito finos é uma estratégia para manter a capacidade de adsorção de pós de elevada área superficial, e simultaneamente conferir-lhes maior facilidade de manuseio e operação [40]. Os métodos descritos na literatura para produzir grânulos aproximadamente esféricos são geralmente baseados na aglomeração de partículas pequenas, que pode ser alcançada por atomização de suspensões de partículas. O resultado de morfologia esférica é uma consequência da tendência do sistema para minimizar a energia de superfície [77].

2.5.3. Mecanismos de liberação do fármaco

Para se poder formular corretamente um sistema de liberação controlada, é necessário ter um profundo conhecimento dos diferentes mecanismos implicados na liberação do fármaco. Podemos classificar os processos de liberação de um fármaco numa das três categorias seguintes: difusão, degradação/erosão polimérica e liberação por um

processo de ativação. Estes processos podem ocorrer simultaneamente ou não [78]. Na secção que se segue abordar-se-ão, de uma forma mais detalhada, os três tipos de libertação de fármaco.

2.5.3.1. Difusão

A difusão é o processo pelo qual a matéria é transportada de um local para outro situado no interior de um mesmo sistema e resulta de um conjunto de movimentos moleculares aleatórios que ocorrem em pequenas distâncias [78]. A força motriz da difusão é a existência de gradientes de concentração.

A lei de Fick (Eq. 1) permite quantificar o processo de difusão através de uma expressão que traduz a velocidade de transferência, por unidade de superfície, da substância a difundir num meio isotrópico através de uma secção do polímero.

$$\frac{dQ}{dt} = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{Eq. 1})$$

Nesta equação, dQ/dt representa a velocidade de difusão, sendo Q a massa de fármaco transportada, t o tempo, C a concentração da substância que difunde, X a distância e D o coeficiente de difusão. Dado que a difusão ocorre no sentido oposto ao do aumento da concentração, o segundo termo aparece com sinal negativo.

Frequentemente o fármaco está revestido por uma membrana polimérica ou incorporado numa matriz polimérica e, nestes casos, ocorrem os seguintes fenómenos de difusão [72, 78]: a água difunde do meio exterior ao polímero até à membrana ou através da matriz e o fármaco dissolve-se e difunde através da matriz para o meio exterior ao polímero. Assim a taxa de libertação diminui com o tempo uma vez que as moléculas do fármaco localizadas próximas da superfície são libertadas primeiro (têm a distância mais curta a percorrer por difusão).

2.5.3.2. Degradação/Erosão

A degradação/erosão polimérica, quando acontece, também contribui para o mecanismo de libertação do fármaco.

Os sistemas de libertação controlada de fármacos à base de polímeros biodegradáveis têm a potencial vantagem da matriz de suporte se dissolver propiciando a simultânea libertação do fármaco, de forma a que nenhum material residual permaneça no tecido vivo. Esta vantagem deve ser ponderada com a desvantagem dos polímeros

biodegradáveis introduzirem um nível de complexidade adicional no desenho de matrizes como SLCF. Além disso, a degradação e erosão do polímero podem libertar produtos de degradação prejudiciais ao corpo humano. Por conseguinte, a descoberta de polímeros biodegradáveis úteis como veículos de SLCF concentrou-se em materiais que se degradam em espécies químicas inertes e de forma controlada [72].

A degradação/erosão pode ocorrer apenas à superfície do sistema (erosão heterogénea) ou também pode ocorrer no interior (erosão homogénea). O modo como ocorre a erosão condiciona o perfil de libertação. Para fármacos muito solúveis, a libertação será principalmente determinada pela difusão do fármaco. Porém para fármacos pouco ou muito pouco solúveis a libertação será controlada pelo processo de erosão. Na erosão homogénea a degradação ocorre na estrutura polimérica de forma aleatória pelo que a velocidade de libertação é muitas vezes imprevisível. Este problema é teoricamente eliminado nos casos em que ocorre a erosão heterogénea. Nestes, a velocidade de libertação do fármaco é proporcional à taxa de degradação do polímero uma vez que o fármaco vai-se difundindo à medida que o polímero se degrada [78].

Quando um sistema matricial é posto em contacto com o líquido de dissolução, a água começa a penetrar na matriz, originando uma camada de polímero gelificado e um aumento das suas dimensões (intumescimento). Com o decorrer do tempo, o núcleo seco hidrata-se e vai-se reduzindo, enquanto a camada exterior gelificada vai sofrendo erosão. Numa fase posterior, a taxa de hidratação diminui em relação à de erosão, e por fim as cadeias dos polímeros dissociam-se dando lugar à total dissolução do fármaco [78]. A Figura 14 representa esquematicamente as etapas de intumescimento e degradação/erosão do *scaffold* com consequente libertação do fármaco.

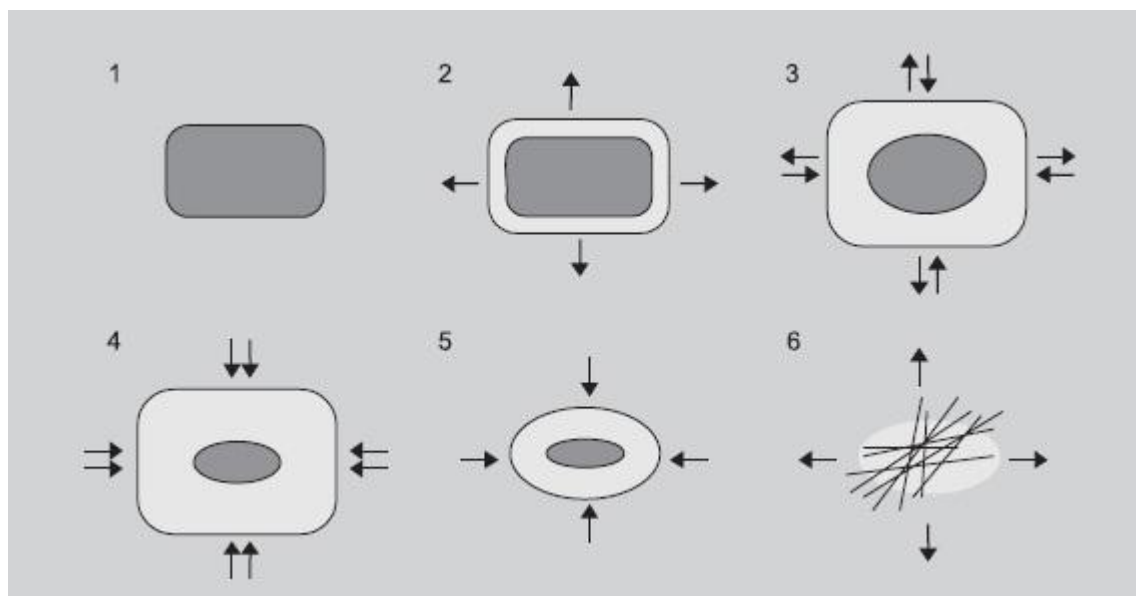


Figura 14 - Etapas do comportamento dos sistemas matriciais hidrofílicos quando intumescem e sofrem erosão: 1) matriz no estado seco; 2) início da hidratação e intumescimento da matriz, 3) e 4) aumento da hidratação e intumescimento da matriz, diminuição do núcleo seco e início da erosão da matriz polimérica; 5) aumento da erosão e 6) separação das cadeias poliméricas com liberação do fármaco restante.

Retirado de ref. [79].

No caso particular de matrizes hidrofílicas o comportamento de intumescimento, resultante de um processo de relaxamento das cadeias poliméricas quando em contacto com o meio aquoso, é mecanicamente descrito pela formação de “frentes”. Neste contexto, a palavra “frente” identifica o local da matriz onde se verifica nítida mudança das condições físicas. Numa observação macroscópica do processo de intumescimento progredindo do centro da matriz para a periferia, identificam-se três frentes: a frente de intumescimento, a de difusão e a de erosão. Estas três frentes estão representadas esquematicamente na Figura 15.

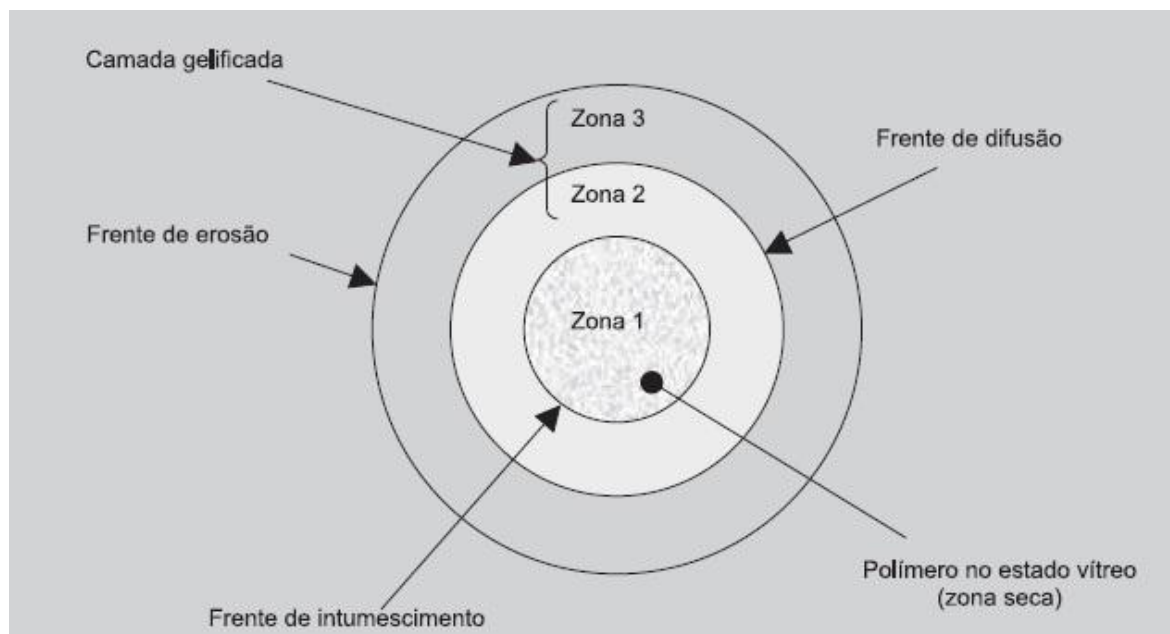


Figura 15 - Esquema ilustrativo das frentes de movimento (intumescimento, difusão e erosão) durante a libertação de fármacos a partir de sistemas matriciais intumescíveis: zona 1 – polímero no estado seco, zona 2 e 3 – polímero no estado maleável (ou de gel).

Retirado de ref. [79].

A frente de intumescimento corresponde à interface polímero no estado seco/camada gelificada (estado maleável), e é na realidade a frente de penetração da água. A segunda frente, chamada frente de difusão situa-se entre a frente de intumescimento e a frente de erosão na camada gelificada. Da camada de gel fazem parte duas zonas distintas, zonas 2 e 3. A principal diferença entre estas zonas é o estado de dissolução do fármaco. Na zona 2, o fármaco está presente no estado não dissolvido podendo, alguma parte dele, existir simultaneamente na forma dissolvida. Na zona 3, o fármaco encontra-se dissolvido. Uma terceira frente, ou frente de erosão, estabelece simplesmente a ligação entre a superfície da matriz e o meio de dissolução e corresponde à interface camada de gel/meio de dissolução (água ou solução tampão).

2.5.3.3. Libertação por ativação

Vários SLCF recorrem a processos de ativação, por forma a controlarem a libertação do fármaco. Estes sistemas libertam o fármaco mediante algum estímulo químico ou físico, tais como mudança de pH, força iônica e temperatura. Apesar de conseguirem frequentemente libertações a velocidade constante, costumam ser bastante dispendiosos.

2.5.4. Fármaco Dexametasona

A dexametasona, cuja estrutura química se ilustra na Figura 16, é um glucocorticóide que aumenta a expressão de vários genes associados à diferenciação osteogénica e que tem sido reportado para induzir a iniciação da diferenciação das células da medula óssea bem como para dirigir as células para a maturação terminal na fase tardia da diferenciação [9, 80, 81].

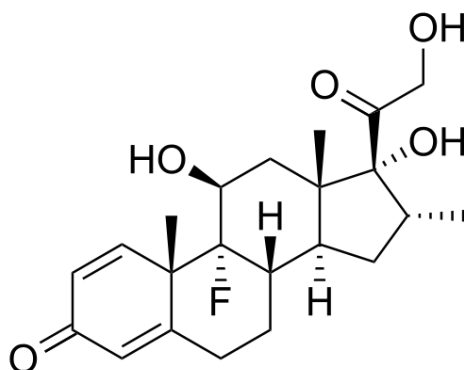


Figura 16 - Estrutura química da DEX.

Retirado de ref. [9].

A DEX tem sido alvo de vários estudos exploratórios da sua capacidade para regeneração óssea. Recentemente, Son *et al* [81] testaram a eficácia deste fármaco imobilizando-o em microesferas biodegradáveis de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e incorporando-as em *scaffolds* de HAp. Após 4 semanas de implantação dos *scaffolds* em defeitos femorais de cães, verificaram que houve um maior volume de formação de osso nos *scaffolds* de HAp carregados com as microesferas do que nos *scaffolds* apenas de HAp, como ilustrado na Figura 17.

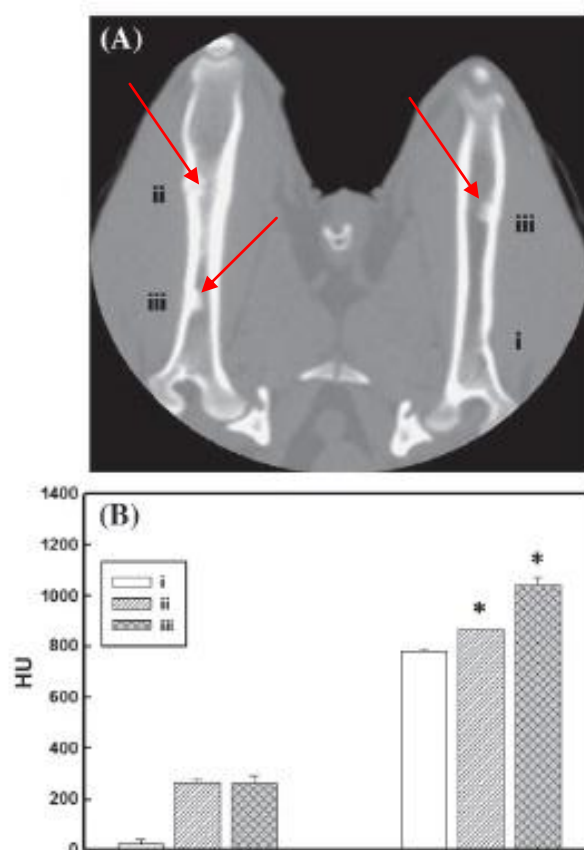


Figura 17 – Tomografia computadorizada (A) e perfil de Hounsfield (B) do (i) defeito vazio (sem HAp), do (ii) controle, HAp (sem microesferas), e de (iii) microesferas de PLGA carregadas com DEX e incorporadas em *Scaffolds* de HAp após 10 semanas de implantação no fêmur de cães. No gráfico da escala de Hounsfield estão representados os dados referentes ao volume ósseo (barras do lado esquerdo) e à densidade óssea (barras do lado direito).

Adaptado de ref. [81].

Como mostrado na Figura 17 A observa-se a formação de “pontes” (identificadas pelas setas) a partir do defeito ósseo. Foram medidos os valores de Hounsfield (Figura 17 B) do defeito ósseo vazio (i), do defeito preenchido com HAp (ii) e do defeito preenchido com HAp e microesferas de PLGA carregadas com DEX (iii) apresentando valores de 775, 862 e 1042 respectivamente, indicando assim uma densidade óssea significativamente maior para os *scaffolds* de HAp com microesferas de PLGA carregadas com o fármaco quando comparada com os defeitos vazios e os *scaffolds* apenas de HAp.

Alguns estudos sugerem que a concentração terapêutica efetiva da DEX encontra-se na gama de 10nM (40ng/mL) e 100nM (400ng/mL) e mostram efeitos tóxicos acima dos 1000nM (4000ng/mL) [81].

Os SLCF de natureza polimérica com incorporação de DEX, reportados na literatura, evidenciam perfis de liberação do fármaco semelhantes [9, 10], dado que a

libertação do fármaco a partir destes sistemas envolve uma primeira etapa correspondente ao intumescimento da matriz polimérica e à libertação simultânea do fármaco seguida de uma segunda fase em que ocorre a degradação da respetiva matriz. As Figuras 18 e 19 ilustram perfis de libertação a partir de matrizes de CH e as Figuras 20 e 21 a partir de matrizes compósitas de amido e PLLA e compósitas de PLLA e HAp respetivamente, em que ocorreu intumescimento.

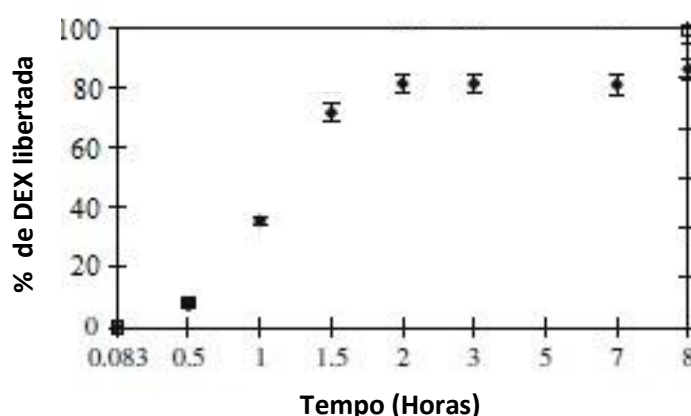


Figura 18 – Perfil de libertação da DEX a partir de *scaffolds* de CH preparados pelo método do fluido supercrítico.

Adaptado de [9].

Duarte *et al* [9] produziram *scaffolds* de CH carregados com DEX, pelo método do fluido supercrítico, confirmando o facto do CH ser um polímero hidrofílico e assim suscetível a captação de grande quantidade de água. A difusão da água para o interior da matriz polimérica provoca o seu intumescimento facilitando a difusão da DEX para o exterior da matriz ocasionando uma rápida libertação (~90%) logo ao fim de 2 horas (Figura 18).

Como já foi referido anteriormente, a incorporação de agentes de reticulação em *scaffolds* melhora o seu desempenho mecânico. No entanto, também são conhecidos estudos em que o agente de reticulação retarda a libertação do fármaco. Denkbaz *et al* produziram *scaffolds* de CH, por *wet spinning*, carregados com um fármaco modelo (5 Fluorouracil, 5FU) e reticulados com glutaraldeído. O perfil de libertação do 5FU a partir dos *scaffolds* com diferentes concentrações de fármaco e a influência do GA no perfil de libertação do respetivo fármaco estão representados na Figura 19 (a e b).

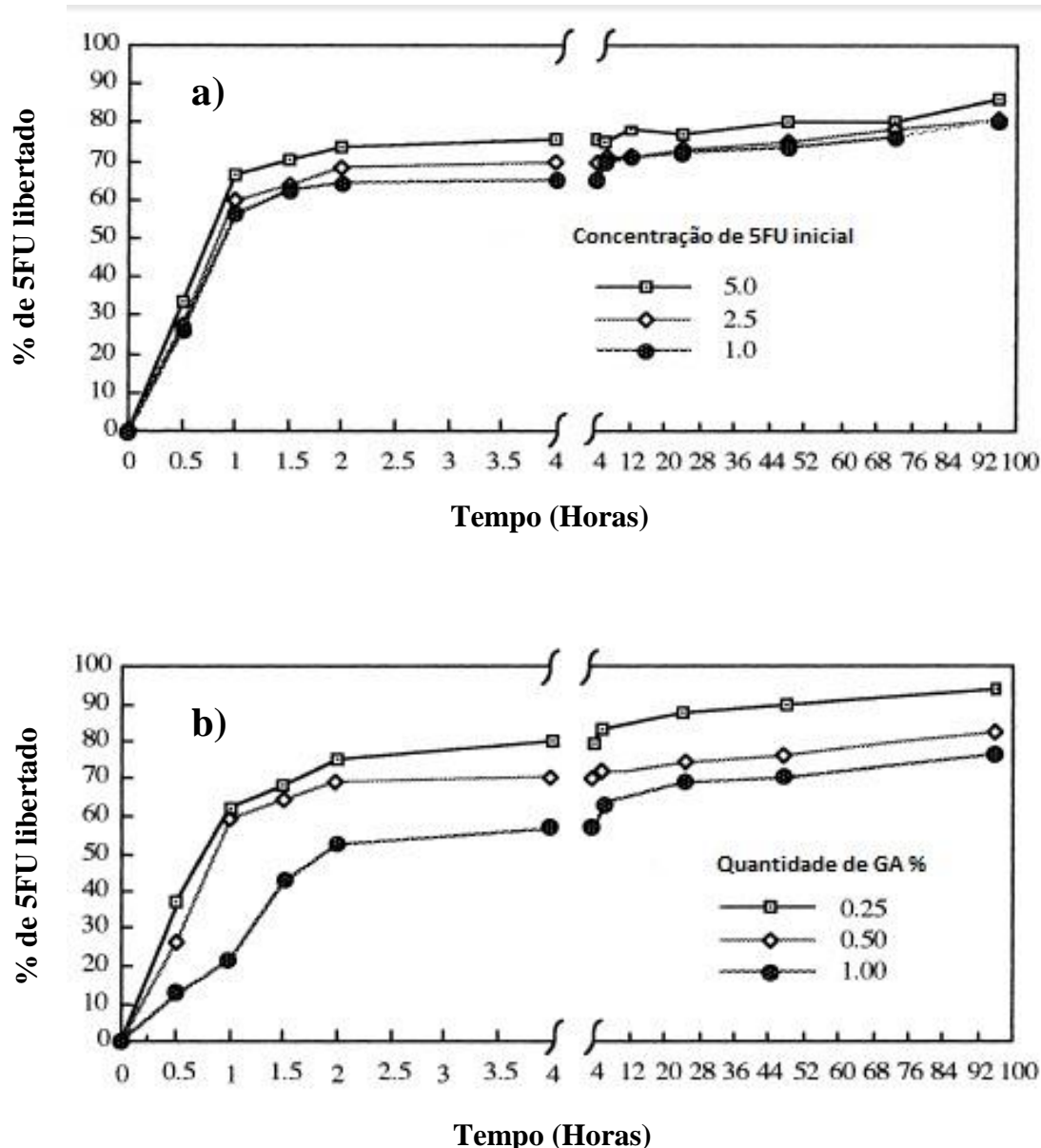


Figura 19 - Perfil de libertação do 5FU a partir de *scaffolds* de CH com diferentes concentrações de a) 5FU e b) GA.

Adaptado de [82]

Como demonstrado na Figura 19 a) o 5FU é libertado muito rapidamente numa fase inicial (cerca de 60-70% ao fim de 90 minutos) seguido de uma libertação muito mais lenta e prolongada. As curvas de libertação a partir dos *scaffolds* de CH carregados com 5FU parecem bastante semelhantes (paralelas) às curvas de libertação sem o agente de reticulação (Figura 19 b)) o que nos permite afirmar que os mesmos mecanismos de libertação são semelhantes em ambos os casos. A libertação do 5FU “obedece” a um

mecanismo de libertação controlado por *swelling*, especialmente no período inicial de libertação. Após este período, no qual o intumescimento atinge o equilíbrio, a libertação é provavelmente controlada por um mecanismo de difusão. Este é um comportamento esperado no caso das matrizes hidrofílicas; primeiro ocorre a hidratação e penetração da água para a matriz, durante a qual ocorrem elevadas quantidades de libertação do fármaco uma vez que este se encontra perto da superfície da matriz. Depois de formada a estrutura gelificada ocorre a libertação do fármaco, mas de modo lento e prolongado, através de mecanismos de difusão. No entanto, verifica-se para os *scaffolds* reticulados que quanto maior é o teor em reticulante mais retardada é a libertação o que pode ser explicado pelo facto do agente de reticulação causar uma diminuição na taxa de intumescimento da matriz.

São também várias as referências associadas à libertação de fármaco a partir de matrizes poliméricas compósitas. Duarte *et al* [10] produziram, pelo método do fluido supercríticos, *scaffolds* compósitos de PLLA e amido carregados com DEX. A Figura 20 mostra o perfil de libertação obtido para diferentes concentrações da DEX nos respetivos *scaffolds*.

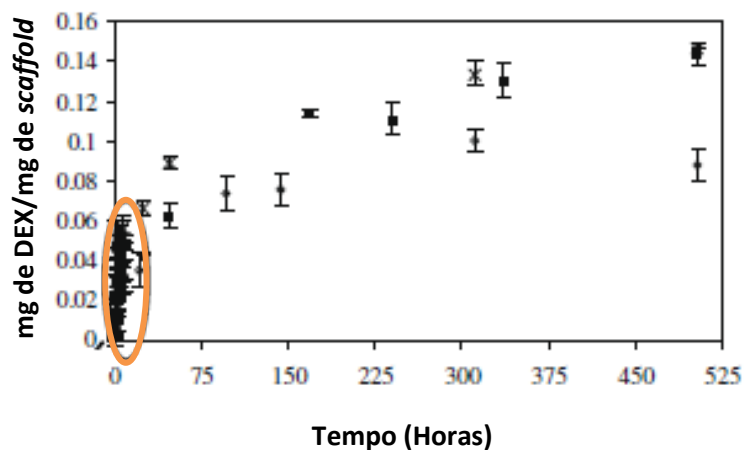


Figura 20 – Perfis de libertação da DEX a partir de *scaffolds* de amido e PLLA, preparados pelo método do fluido supercrítico, com diferentes concentrações de fármaco: ■ 5%; ◇ 10% e * 15% (massa de fármaco/massa de polímero)

Adaptado de [10].

Pode observar-se, pela análise da Figura 20, que os perfis de libertação para as diferentes concentrações de fármaco são semelhantes, o que pode justificar-se pelo facto de

a matriz polimérica ser a mesma. Observa-se também uma liberação inicial da DEX muito rápida (aproximadamente até 8 horas) seguida de uma liberação lenta até aos 21 dias, o que sugere que a rápida liberação inicial se deve ao intumescimento inicial da matriz seguindo-se então a degradação/erosão da mesma levando a uma liberação lenta e prolongada.

Zamoume *et al* [33] introduziram HAp carregada com um antibiótico (metronidazol) em *scaffolds* de PLLA obtendo os perfis de liberação representados na Figura 21.

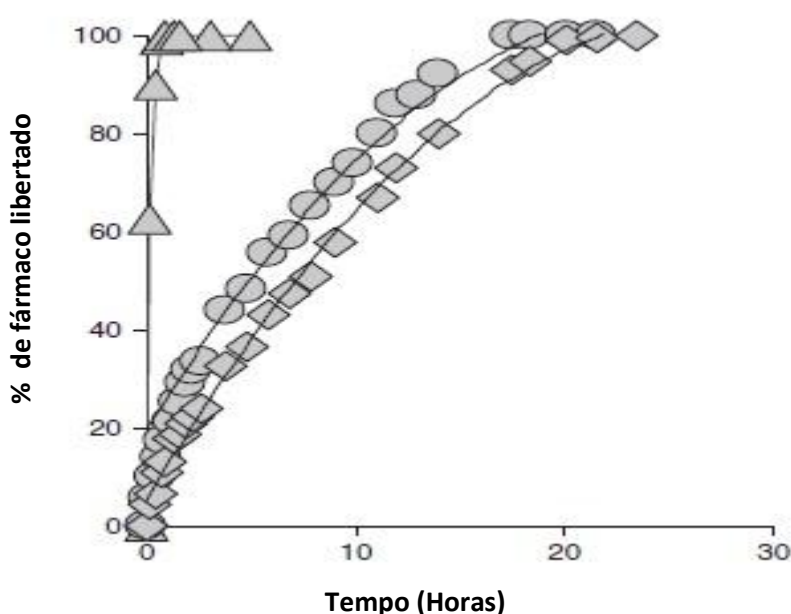


Figura 21 - Liberação do metronidazol a partir de *scaffolds* compósitos de PLLA/HAp carregados com o fármaco. Os triângulos correspondem a *scaffolds* sem PLLA; os círculos e os losangos aos *scaffolds* com 20 e 29% de PLLA, respetivamente.

Adaptado de [33].

Pode verificar-se pela análise da Figura 21 que na ausência de matriz polimérica há uma rápida liberação do fármaco, atingindo-se 100% de liberação após 10 minutos. Ao incorporar o metronidazol na matriz polimérica de PLLA verifica-se que a sua liberação é significativamente retardada, libertando cerca de 50% ao fim de 10 horas.

Tendo em conta os perfis de liberação analisados anteriormente (Figuras 18 a 21) pode afirmar-se que a incorporação de polímeros nos SLCF contribui para retardar a

libertação do fármaco. Por outro lado, o intumescimento do polímero nas primeiras horas de libertação é um comportamento ao qual frequentemente se atribui a rápida libertação do fármaco observada no período inicial, sendo comum em todas as matrizes anteriormente referidas. Por forma a controlar este efeito poder-se-á reticular a matriz com um agente de reticulação criando ligações químicas fortes entre o reticulante e o polímero e assim controlar a taxa de intumescimento da matriz. Outro fator importante que pode influenciar o perfil de libertação do fármaco está diretamente relacionado com as técnicas de fabricação dos *scaffolds*, isto é, no caso das matrizes poliméricas hidrofílicas deve recorrer-se a métodos de fabricação que produzam porosidade elevada, de modo a facilitar a difusão da água para dentro da matriz e assim libertar o fármaco.

CAPÍTULO 3

FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Estudos anteriores realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica [7] demonstraram que *scaffolds* compósitos de CH/grânulos de hidroxiapatite carregados com DEX se apresentaram promissores para aplicações em ET e simultaneamente como SLCF. No entanto nesta tese pretendeu-se melhorar o desempenho biológico do *scaffold* pelo facto de se substituir parte da HAp por um outro fosfato de cálcio mais reabsorvível, o β -TCP, e simultaneamente avaliar-se o efeito desta substituição no perfil de libertação do fármaco. Para investigar a potencialidade de *scaffolds* compósitos para regeneração óssea e como possíveis sistemas de libertação controlada de fármacos, no presente trabalho, preparar-se-ão diferentes *scaffolds*, de base polimérica (CH), nos quais se incorporarão grânulos de fosfatos de cálcio carregados com o fármaco modelo selecionado (a dexametasona). O perfil de libertação do fármaco a partir desses *scaffolds* será posteriormente caracterizado para avaliar o impacto dos parâmetros de processamento no desempenho do *scaffold*. Um dos principais parâmetros em foco no presente estudo será a composição dos grânulos, que se pretendem bifásicos. Neste sentido serão preparados por atomização grânulos bifásicos carregados com DEX, isto é, grânulos de misturas de HAp com β -TCP, usando três proporções distintas (HAp/ β -TCP): (100/0), (70/30) e (50/50). Estudar-se-á o perfil de libertação da DEX de cada tipo de grânulo, bem como a possibilidade de os incorporar na matriz polimérica de CH, de modo a condicionar a libertação da DEX. Assim serão produzidos, por separação de fase sólido/líquido e subsequente liofilização, três tipos de matrizes poliméricas ou *scaffolds*, reforçadas com os três tipos de grânulos.

Com vista à otimização de algumas características dos *scaffolds*, designadamente propriedades mecânicas, bioatividade e biocompatibilidade, modificar-se-ão alguns parâmetros experimentais já previamente explorados no estudo “Suportes à base de quitosano para regeneração óssea” como por exemplo a concentração da solução de ácido acético na qual se dissolve o CH e a adição de um agente de reticulação, o glutaraldeído.

Assim, produzir-se-ão *scaffolds* usando uma concentração de ácido acético mais baixa, 0,2M, em vez de 2M, e estudar-se-á o seu efeito na biocompatibilidade celular. Avaliar-se-á também o efeito da incorporação do glutaraldeído nas propriedades mecânicas e o efeito da inclusão de diferentes CaP na bioatividade e libertação da DEX dos *scaffolds*.

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho experimental realizado abrangeu as seguintes etapas, representadas resumidamente pelo fluxograma da Figura 22: i) preparação e caracterização de grânulos de fosfatos de cálcio (HAp e bifásicos) carregados com DEX por atomização, ii) fabricação e caracterização de *scaffolds* compósitos de (CH/grânulos de fosfatos de cálcio) pelo processo de separação de fase induzida termicamente e subsequente liofilização, iii) monitorização da libertação da DEX nos grânulos e nos *scaffolds*, iv) ensaio das propriedades mecânicas dos *scaffolds* e v) estudos de bioatividade e biocompatibilidade dos respetivos *scaffolds*.

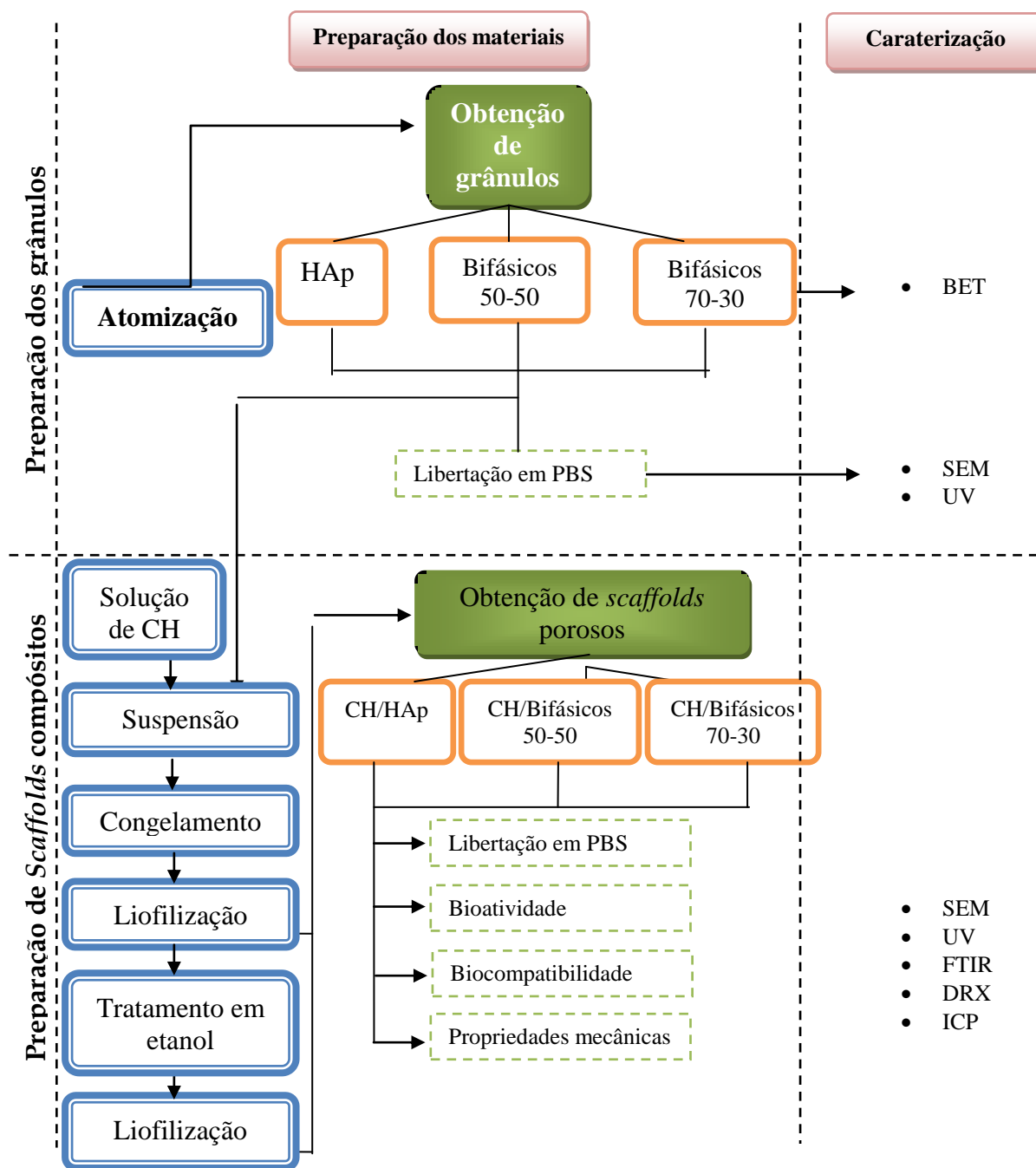


Figura 22 – Fluxograma do procedimento experimental.

4.1. Materiais e reagentes

Utilizou-se uma suspensão comercial de nanopartículas de HAp (NanoXIM, Fluidinova) com concentração igual a 5% (peso/volume) e uma suspensão de β -TCP (Fluka) com concentração igual a 30% (peso/volume). Ambas as suspensões foram diluídas de modo a obter suspensões com concentração 0,1% (peso/volume) de fosfatos de cálcio. O fármaco modelo utilizado foi a dexametasona (96% da ACROS organics, USA).

Para o fabrico dos *scaffolds* usaram-se os materiais anteriormente mencionados e (1) quitosano (Aldrich, com grau de desacetilação igual a 80%, aproximadamente) e (2) ácido acético (Merck, 100%).

Para a reticulação dos *scaffolds* utilizou-se glutaraldeído (Grade II, 25% em H₂O) da Sigma-Aldrich.

Para a preparação da solução tampão de fosfatos ou tampão fosfato-salino (PBS) utilizou-se a mistura dos componentes de fosfato fornecida pela Sigma.

Para a preparação da solução simuladora do plasma humano (SBF) foram utilizados os seguintes reagentes: 1) NaCl (Merck 99,5%), 2) NaHCO₃ (Riedel-de-Han 99,7%), 3) KCl (Merck 99,5%), 4) K₂HPO₄.3H₂O (Merck 99%), 5) MgCl₂.6H₂O (Merck 99%), 6) HCl (Merck), 7) CaCl₂.6H₂O (Fluka 99%), 8) Na₂SO₄ (Panreac 99%) e 9) CNH₂(CH₂OH)₃ (Riedel-de-Han 99,5%).

Para os ensaios de biocompatibilidade foram utilizadas 1) células MG-63, 2) soro bovino fetal (Gibco[®] 10108-165), 3) penicilina, 4) estreptomicina, 5) fungizona, 6) tripsina, 7) ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 8) brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

4.2. Métodos de preparação e técnicas de caracterização

4.2.1. Preparação e caracterização dos grânulos de fosfato de cálcio

Prepararam-se suspensões aquosas de HAp e misturas bifásicas (β -TCP/HAp nas razões 50/50 e 70/30; as razões são massa β -TCP/massa HAp) às quais se adicionou DEX (10% em peso de DEX em relação aos fosfatos de cálcio) num volume total de 500mL. O β -TCP, antes de utilizado na atomização, foi moído num moinho planetário durante 48 horas por forma a obter-se um pó com distribuição granulométrica homogénea e, idealmente, tamanho médio de partícula $\leq 1 \mu\text{m}$.

As suspensões de fosfatos de cálcio em solução de DEX foram usadas na alimentação de um atomizador laboratorial Mini Spray Dryer Buchi-191 (Figura 23) utilizando um bico de 73 μ m, uma bomba a 20%, um aspirador a 80% e uma temperatura de secagem na câmara de atomização de 180°C. Estas condições operatórias do atomizador já haviam sido otimizadas em trabalhos anteriores [7].



Figura 23 – Atomizador laboratorial Mini Spray Dryer Buchi-191.

Os grânulos de fosfatos de cálcio preparados foram avaliados através de diferentes técnicas.

A distribuição de tamanhos de partícula foi analisada num instrumento de dispersão laser (COULTER LS230, UK), com um modelo ótico Fraunhofer.

A área superficial específica foi determinada por adsorção de azoto num equipamento Micromeritis Gemini 2370 V5.00 (Norcross, USA), usando a isotérmica de adsorção Brunauer, Emmett e Tellerum (BET).

As fases cristalinas presentes nos diferentes grânulos foram identificadas por difração de raio-X (DRX), usando um difratómetro Rigaku Geigerfle D/Max-SérieC,

equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40kV e uma corrente de 30mA, usando a radiação $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$).

A morfologia dos pós foi observada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) num microscópio Hitachi modelo S-4100 provido de um sistema de emissões de elétrons com um filamento de tungstênio com potencial de aceleração de 10kV e resolução máxima de 15\AA . As amostras de pó para observação por SEM foram preparadas dispersando-se uma pequena quantidade de pó em fita-cola de carbono a qual foi fixada num porta amostras de alumínio. Todas as amostras foram recobertas com carbono num depositador de carbono.

Nas secções que se seguem, por razões de simplicidade, os grânulos de HAp+DEX, os grânulos bifásicos (50/50)+DEX e os grânulos bifásicos (70/30)+DEX passarão a ser designados por HAp, bifásicos 50-50 e bifásicos 70-30.

4.2.2. Preparação e caracterização dos *scaffolds* compósitos

Os *scaffolds* compósitos foram preparados com uma razão [quitosano:fosfatos de cálcio] de [2:1]. Preparou-se, sob agitação, uma solução de CH por dissolução deste numa solução de ácido acético 0,2M, mantendo o pH aproximadamente igual a 5, por forma a obter uma solução polimérica com concentração 2% (massa de polímero/massa final de solução). A esta solução adicionaram-se, sob agitação, as quantidades adequadas de grânulos de HAp e bifásicos carregados com DEX de modo a obterem-se suspensões com concentração de 1% em peso. Para melhorar as propriedades mecânicas, dissolveu-se 0,01% [$\%=(\text{massa de GA}/\text{massa de polímero})\times 100$] de glutaraldeído na solução de quitosano. Depois de preparadas as suspensões de grânulos de fosfatos de cálcio em quitosano foram vazadas em moldes cilíndricos e colocadas numa arca frigorífica a uma temperatura de -20°C , durante 24 horas no mínimo. Após este período colocaram-se os moldes num liofilizador Labconco freeze DrySystem com pressão 12×10^{-3} mbar e temperatura -52°C (Figura 24) durante 4 dias por forma a remover o solvente por sublimação.

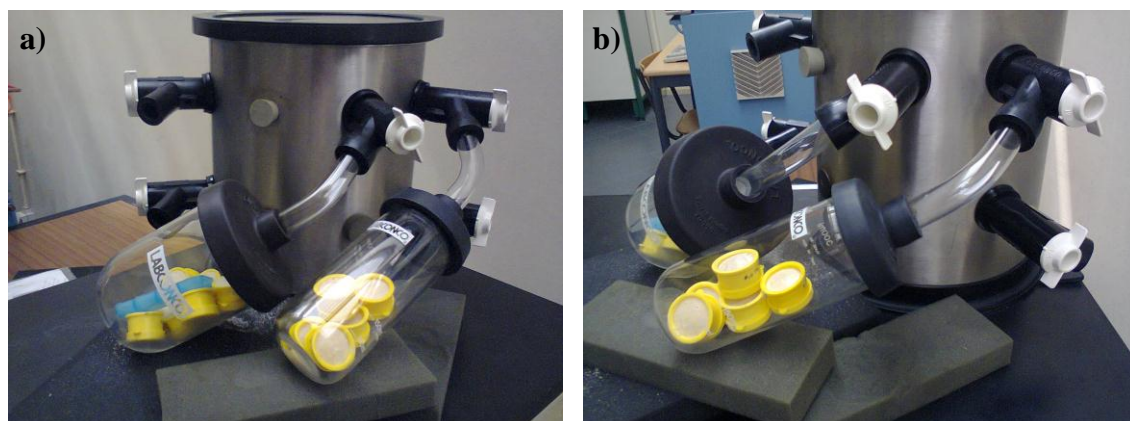


Figura 24 – a) e b) Equipamento utilizado para liofilização de *scaffolds*.

Depois de retirados do liofilizador (passados os 4 dias) procedeu-se ao tratamento das amostras em etanol seguindo o procedimento descrito por Madihally *et al* [45]: os *scaffolds* foram inicialmente colocados em etanol absoluto durante 1 hora, seguidamente em etanol a 70% (volume/volume) durante 30 minutos e finalmente em etanol a 30% (volume/volume) durante 30 minutos. Após o tratamento das amostras em etanol procedeu-se a um congelamento rápido em azoto líquido (-196°C) seguido de liofilização durante 1 dia. Por fim retiraram-se os *scaffolds* dos moldes e colocaram-se em excicador até a sua posterior caracterização.

Para a identificação dos grupos funcionais presentes nos *scaffolds* recorreu-se à espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros do FTIR foram obtidos em modo de transmitância, resolução 4cm^{-1} , com acessório de ATR (*Attenuated total reflection Golden Gate*) num espectrómetro de infravermelho, marca Bruker, modelo tensor 27. As fases cristalinas foram analisadas por difração de raio-X (DRX) e a morfologia foi observada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Para se preparar as amostras para SEM fizeram-se cortes transversais nos *scaffolds* que se fixaram com fita-cola de carbono em porta-amostras de alumínio. As amostras foram recobertas com carbono num depositador de carbono.

Os *scaffolds* foram também submetidos a ensaios de compressão uniaxial, num equipamento Bose Smart Test, Electroforce[®], para caracterização do módulo de Young e da resistência à compressão. Este método foi o escolhido uma vez que a maioria dos *scaffolds* utilizados em tecidos ósseos estão sujeitos a esforços predominantes de compressão [83,

84]. Colocaram-se as amostras centradas no prato compressor inferior no início de cada ensaio, como demonstrado na Figura 25.

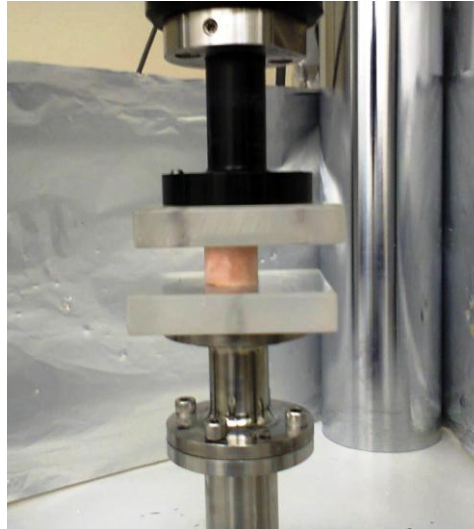


Figura 25 - Ensaio da resistência mecânica dos *scaffolds*.

Durante os ensaios efetuou-se o registo simultâneo da força e do deslocamento do prato compressor superior através do sistema de aquisição de dados tendo-se utilizado uma velocidade de deslocamento do prato compressor superior constante de 1mm/min. Os ensaios foram realizados no mínimo em três *scaffolds* de cada tipo e até se alcançar cerca de aproximadamente 60-70% de deformação *do scaffold* [62].

Para construir a curva tensão-deformação foi necessário determinar, a partir dos valores de força e deslocamento registados durante os ensaios, os respetivos valores da tensão e da deformação axiais. A tensão nominal determina-se através do quociente entre a força aplicada e a área da secção transversal à direção de aplicação da força, do seguinte modo:

$$\sigma(MPa) = \frac{F}{A_0}$$

onde F é a força de compressão uniaxial e A_0 é a área inicial da superfície que suporta a força aplicada. A deformação do material é obtida pela divisão da variação de altura pela altura inicial:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0}$$

onde a variação da altura é dada por $\Delta h = h - h_0$ e h_0 é a altura inicial real.

4.3. Estudos de libertação de fármaco e testes *in vitro*

4.3.1. Libertação em PBS

Foram realizados estudos de libertação da DEX em PBS com pH 7,4 a uma temperatura de 37,4°C, tanto em grânulos como em *scaffolds*. Foi preparada uma solução tampão fosfato-salino com concentração 0,01M. Nos estudos de libertação da DEX a partir dos grânulos, colocou-se uma certa quantidade de pó (10mg) em frascos de plástico contendo 10mL de PBS e mantidos a 37,4°C. Ao fim de intervalos de tempo pré-definidos (10min, 30min, 1h, 2h, 3h, 5h, 10h, 18h, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 8 dias e 30 dias) com a ajuda de uma pipeta colocou-se uma gota dos grânulos imersos em PBS diretamente num porta-amostras de alumínio e levou-se à estufa a secar para posterior análise em SEM. O restante líquido foi filtrado em filtro de polietileno de 0,22µm com a ajuda de uma seringa e colocado no frigorífico até serem feitas as análises por espectroscopia de UV-Visível para quantificação da DEX libertada. As diferenças morfológicas dos grânulos após ensaios de libertação de DEX em PBS durante 8 dias foram observadas por SEM.

Para os estudos de libertação a partir de *scaffolds*, espécimes com uma massa em torno de 0,24 a 0,27g foram imersos em 200mL de PBS e mantidos a 37,4°C. Após intervalos de tempo pré-definidos (10min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 8h, 1 dia, 4 dias, 8 dias e 30 dias) foram retirados 5mL da solução, filtrados em filtro de polietileno de 0,22µm com a ajuda de uma seringa e colocados no frigorífico até serem feitas as análises por espectroscopia de UV-Visível para quantificação da DEX libertada. Após cada toma, foram repostos 5mL de PBS à solução por forma a manter-se sempre o mesmo volume.

Após 30 dias de libertação em PBS, os *scaffolds* foram observados em SEM, analisados por FTIR e DRX.

A quantificação da concentração da DEX no meio de libertação, tanto no caso dos grânulos como no dos *scaffolds*, foi realizada por espectroscopia de UV-Visível utilizando-se um espectrofotómetro UV-3100 Shimadzu, com o programa UVProbe 2.10, seleccionando-se o comprimento de onda de máxima absorção da DEX (242nm). Para se

relacionar a absorvância UV da DEX com a sua concentração em solução, foi traçada uma curva de calibração utilizando soluções de concentração conhecida de DEX em PBS.

4.3.2. Captação de água e degradação em PBS

A capacidade de captação de água dos *scaffolds* compósitos preparados por congelamento e subsequente liofilização foi determinada usando um método gravimétrico simples [9]. As amostras foram pesadas e imersas em 200mL de PBS a uma temperatura constante de 37,4°C. Após 30 dias de libertação as amostras foram retiradas do PBS e pesadas de maneira a determinar a capacidade de captação de água através da Eq. 2,

$$\% \text{ captação de água} = \frac{W_w - W_i}{W_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo, W_w o peso da amostra “molhada” e W_i o peso da amostra inicial.

Para se avaliar a degradação dos *scaffolds* estimou-se a percentagem de perda de peso [9, 10]. Depois de 30 dias de libertação, as amostras foram liofilizadas e pesadas. Assim, conseguiu-se determinar a perda de peso através da Eq. 3,

$$\% \text{ perda de peso} = \frac{W_f - W_i}{W_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

sendo, W_f o peso da amostra seca, ou seja, após liofilização.

Determinaram-se também a porosidade e a densidade aparente dos *scaffolds* por imersão em etanol [85]. Escolheu-se o etanol não só devido ao facto de o CH e os fosfatos de cálcio serem insolúveis neste álcool, mas também devido ao efeito estabilizador do etanol na estrutura porosa dos *scaffolds* como anteriormente se referiu. Introduziu-se uma amostra de massa W numa proveta contendo um volume (V_1) conhecido de etanol. Registou-se o (volume do etanol + volume do *scaffold*) como V_2 . A diferença ($V_2 - V_1$) representa o volume total do *scaffold* de massa W . Retirou-se da proveta o *scaffold* impregnado com etanol, registando-se o volume do etanol deixado na proveta como V_3 . Calculou-se, assim, o volume total aparente do *scaffold* como sendo:

$$V = V_2 - V_3 \quad (\text{Eq. 4})$$

A densidade aparente do *scaffold*, ρ , foi calculada como

$$\rho = W / (V_2 - V_3) \quad (\text{Eq. 5})$$

e a percentagem de poros abertos no *scaffold*, ε , como

$$\varepsilon = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \quad (\text{Eq. 6})$$

4.3.3. Testes *in vitro*

Os testes *in vitro* exigiram a preparação de soluções que simulam o fluido corporal (SBF). Para preparar 500 mL de SBF, colocaram-se primeiramente 350 mL de água desionizada num recipiente de vidro que se aqueceu até $36,5 \pm 1,5$ °C sob agitação. Os reagentes identificados numericamente, de 1 a 8, na Tabela 3, foram dissolvidos um a um seguindo a sua ordem numérica. O reagente 9 ($\text{CNH}_2(\text{CH}_2\text{OH})_3$) foi adicionado gota a gota até se atingir um pH igual a 7,45. Adicionou-se então HCl 1M por forma estabilizar o pH em 7,42. Adicionou-se novamente o reagente 9 até aumentar o pH até 7,45. Este processo foi repetido até se esgotar o reagente 9. Finalmente, foi adicionado HCl 1M para ajustar o pH para 7,40. A solução foi vertida num balão volumétrico e, subsequentemente, adicionada com água desionizada até se perfazer um volume final de 500 mL [86]. O SBF foi colocado num frigorífico (5-10°C). O prazo de validade desta solução é de apenas 30 dias após preparação.

Tabela 3 - Reagentes usados na preparação da solução SBF.

| Ordem | Reagente | Quantidade | Fornecedor | Pureza (%) |
|-------|--|------------|--|------------|
| 1 | NaCl | 3,998g | Merck | 99,5 |
| 2 | NaHCO ₃ | 0,175g | Riedel-de Han | 99,7 |
| 3 | KCl | 0,112g | Merck | 99,5 |
| 4 | K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 0,114g | Merck | 99 |
| 5 | MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,1525g | Merck | 99 |
| 6 | HCl 1M | 19,5mL | Merck (Solução preparada no laboratório) | |
| 7 | CaCl ₂ .6H ₂ O | 0,274g | Fluka | 99 |
| 8 | Na ₂ SO ₄ | 0,0359g | Panreac | 99 |
| 9 | CNH ₂ (CH ₂ OH) ₃ | 3,0285g | Riedel-de Han | 99,5 |
| 10 | HCl 1M | 0-5mL | Merck (Solução preparada no laboratório) | |

O teste de bioatividade foi realizado por imersão do *scaffold* carregado com DEX em SBF. O SBF foi colocado em frascos de plástico e posteriormente na estufa para manter a temperatura a 37,4°C. O volume de SBF que foi usado para testes foi calculado com base na equação

$$V_S = S_a / 10$$

onde V_S é o volume de SBF (mL) e S_a é a área da superfície aparente do espécime (mm²).

Após imersão durante diferentes períodos de tempo (7, 14 e 21 dias), os *scaffolds* foram separados da parte líquida, lavados com água desionizada, congelados em azoto líquido e liofilizados durante pelo menos 24 horas. A morfologia das amostras depois de serem imersas em SBF foi investigada por SEM, as fases cristalinas por DRX e a presença de grupos funcionais por FTIR.

As partes líquidas foram coletadas com uma seringa equipada com filtro de polietileno de 0,22µm e a concentração de Ca²⁺ e PO₄³⁻ foi calculada por espectrometria de emissão ótica por plasma de acoplamento indutivo.

As variações de concentrações de Ca e P, expressas em mg/L, são calculados com base nas seguintes equações:

$$\Delta Ca = [Ca]_0 - [Ca]_t$$

$$\Delta P = [P]_0 - [P]_t$$

onde $[Ca]_0$ e $[P]_0$ são as concentrações iniciais da solução de SBF antes da imersão da amostra e $[Ca]_t$ e $[P]_t$ são as concentrações após a imersão num determinado tempo t . Se ΔCa e ΔP forem positivos isso significa que há uma diminuição das concentrações de íons em solução.

4.4. Biocompatibilidade

Antes de se submeter os *scaffolds* a ensaios celulares, recorreu-se a um estudo prévio de imersão dos *scaffolds*, sem fármaco, num meio de cultura para testar a variação do pH do respetivo meio. Posteriormente os *scaffolds* foram sujeitos a ensaios de interação com células. Os ensaios foram realizados no laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária do Porto.

Os *scaffolds* submetidos a ensaios de biocompatibilidade não continham DEX.

Caraterísticas gerais da população celular

A linha celular MG-63 (ATCC, CRL-1427TM) é derivada de células de um tumor ósseo humano (osteossarcoma), apresentando diversas caraterísticas fenotípicas das populações osteoblásticas, nomeadamente a expressão de níveis elevados de fosfatase alcalina, osteocalcina, colagénio tipo I e osteoprotegerina – marcadores específicos do fenótipo osteoblástico. Esta linha celular é frequentemente utilizada na avaliação da citocompatibilidade de biomateriais que visam o contato com o tecido ósseo.

Estabelecimento e manutenção das culturas celulares

As células MG-63 foram cultivadas em placas de 6 poços (Corning[®] Costar[®], 3506) em meio de cultura α -MEM suplementado com 10% (volume/volume) de soro bovino fetal (Gibco[®] 10108-165), 100 UI/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomicina e 2.5 mg/ml de fungizona, à temperatura de 37°C e atmosfera húmida (95% de ar e 5% de CO₂).

Para a realização das experiências, as células aderentes foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,05% (massa/volume) e EDTA 0,02% (massa/volume) durante aproximadamente 5 minutos. Foi obtida uma suspensão celular cuja concentração foi determinada num hematocitómetro (Nihon Koheden[®], Celltac MEK-5103K). Seguidamente, as células foram cultivadas à densidade de 2×10^4 células/cm² em placas de

12 poços (Corning® Costar®, 3513), nas condições de cultura previamente referenciadas. Logo após o estabelecimento da cultura, as amostras dos diferentes biomateriais foram introduzidas nos poços de cultura, na ausência de um contacto direto com as populações celulares. Desta forma, foi realizada a avaliação do comportamento das culturas celulares, na presença dos diferentes biomateriais, num modelo de cultura indireto, para avaliação da proliferação/viabilidade e morfologia celulares.

Caraterização das culturas celulares - Avaliação da proliferação/viabilidade celular pelo ensaio do MTT

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na redução do anel tetrazólico e acumulação do sal de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], pelas células viáveis. O MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul/violeta que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular. A observação por microscopia ótica das células marcadas pelos cristais de formazan permite ainda estimar a morfologia celular.

Aos 2 e 5 dias de cultura foi adicionada a solução de MTT (5 mg/ml) a cada poço de cultura (6 poços por condição experimental com uma amostra de biomaterial por poço; n=6) e as células foram incubadas durante 3 horas nas condições referenciadas para a manutenção das culturas celulares (37°C, atmosfera húmida com 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂). As culturas celulares, incubadas com MTT foram observadas por microscopia ótica (Nikon®, TE200 Inverted Research Microscope) e fotografadas com uma ampliação de 40x e 100x.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo, serão analisados e discutidos os resultados que dizem respeito à caracterização e atomização dos fosfatos de cálcio [secção 5.1 e 5.2 respectivamente] e à sua incorporação em *scaffolds* de CH [secção 5.3], bem como à libertação da DEX [secção 5.4], à bioatividade [secção 5.5] e biocompatibilidade [secção 5.6] dos respectivos *scaffolds*.

5.1. Caracterização dos materiais

Avaliaram-se as características morfológicas e cristalinas dos materiais iniciais de HAp e β -TCP. A HAp foi fornecida sob a forma de suspensão aquosa.

5.1.1. β -TCP

Na Figura 26 está representada a curva de frequência de tamanhos de partículas do β -TCP comercial, tal como adquirido, obtida por análise granulométrica.

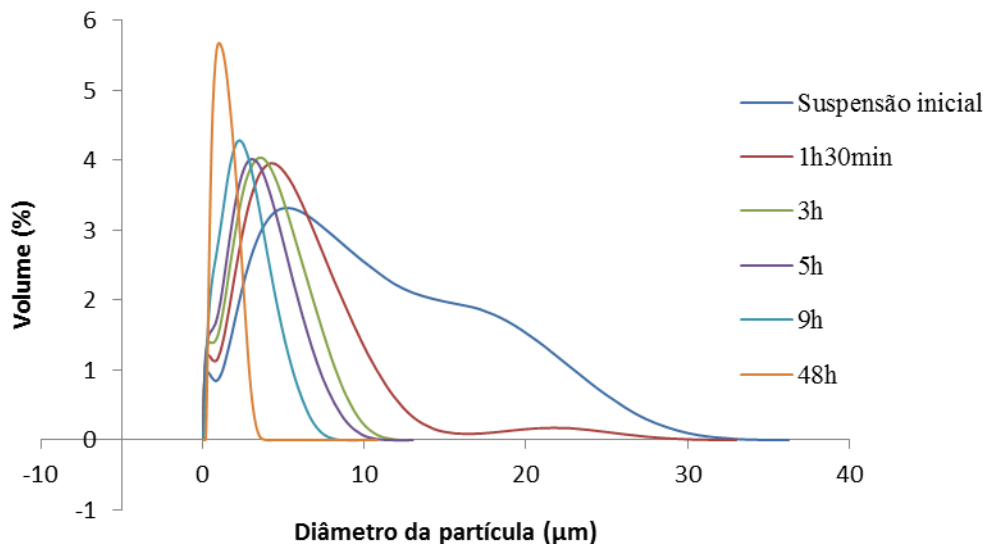


Figura 26 – Curvas de distribuição granulométrica das partículas de β -TCP: —pó inicial e após vários períodos de moagem, — 1h30min, — 3h, — 5h, — 9h e — 48h.

Os resultados permitiram verificar que o material inicial apresenta uma distribuição de tamanhos alargada, indiciando um comportamento bimodal, com um máximo centrado absoluto aproximadamente em 5 μ m; a existência de um segundo máximo a cerca de 18 μ m sugere a provável existência de aglomerados. Esta distribuição alargada suscitou a

necessidade de moagem do pó inicial durante diferentes tempos (1h30min, 3h, 5h, 9h e 48h). Os resultados da análise granulométrica representados na Figura 26 permitem avaliar o impacto do tempo de moagem no tamanho médio de partículas do β -TCP em análise. Constata-se uma redução do tamanho das partículas e uma distribuição mais apertada com o aumento do tempo de moagem. Verifica-se que após 48 horas o material apresenta um tamanho médio de partícula de 1 μm e que, tempos de moagem superiores (Figura 27), não melhoram significativamente a distribuição granulométrica tendo-se assim optado pelas 48h de moagem.

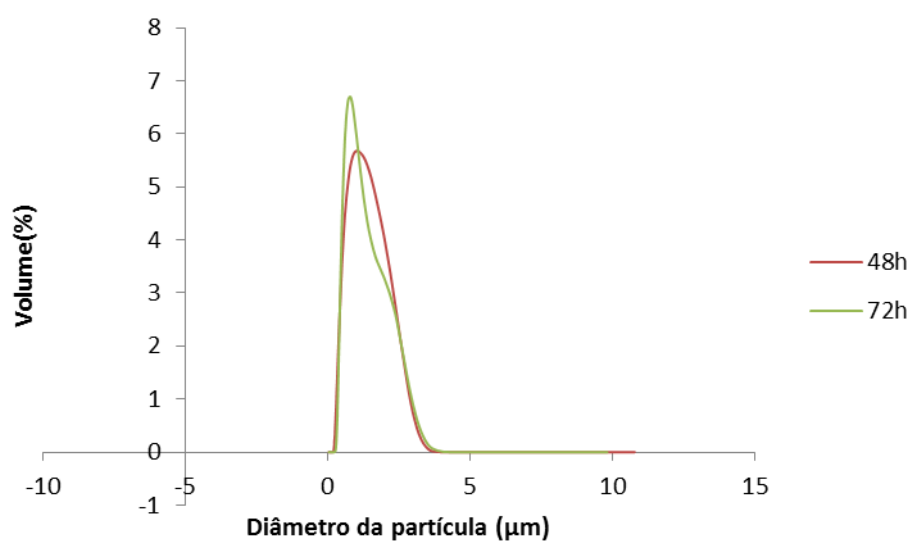


Figura 27 - Distribuição granulométrica após — 48 e — 72h de moagem do β -TCP.

Na Figura 28 a) e b) são apresentadas as imagens obtidas por SEM das partículas de β -TCP inicial e após moagem durante 48 horas.

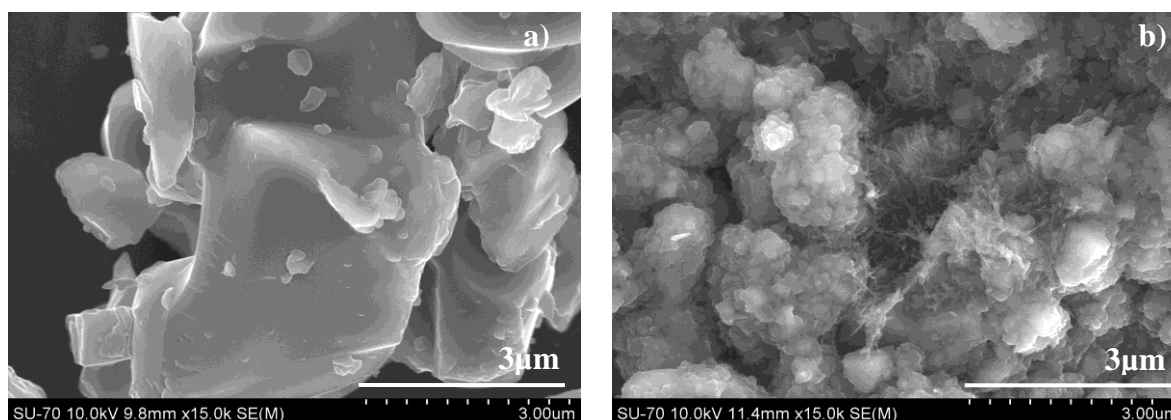


Figura 28 - Micrografias de SEM de partículas de β -TCP: a) partículas de β -TCP inicial e b) partículas de β -TCP após 48h de moagem.

Estas imagens mostram que o material inicial apresenta uma distribuição heterogênea de partículas com formas e tamanhos diversos, com um tamanho médio de partícula de aproximadamente $4\mu\text{m}$; após 48 horas de moagem observam-se partículas com tamanhos menores (aproximadamente $1\mu\text{m}$) e uniformes. Estas imagens permitem confirmar os resultados obtidos através das análises granulométricas. Os valores das áreas superficiais das partículas de β -TCP antes e após 48 horas de moagem são respectivamente de 0,4 e $47,8\text{ m}^2/\text{g}$, corroborando assim os resultados das distribuições granulométricas e as análises de SEM.

Os difratogramas de raio-X do β -TCP inicial e após 48 horas de moagem estão representados na Figura 29 a) e b) respectivamente.

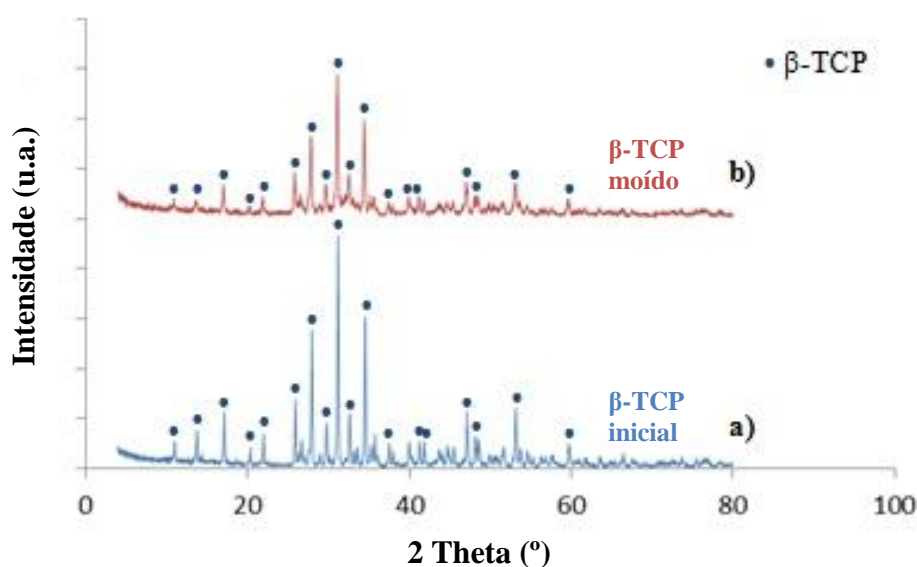


Figura 29 - Difratograma de raio-X do β -TCP: a) pó inicial e b) após 48h de moagem.

Pela análise do difratograma de raio-X verifica-se a presença de uma única fase cristalina, o β -TCP, em ambos os materiais, o que demonstra que a moagem não alterou a composição de fases cristalinas do pó em estudo. Este foi o pó utilizado na atomização posterior.

5.1.2. HAp

Nas Figuras 30 e 31 apresentam-se, respectivamente, as imagens obtidas por SEM e o difratograma de raio-X das partículas de HAp da suspensão comercial.

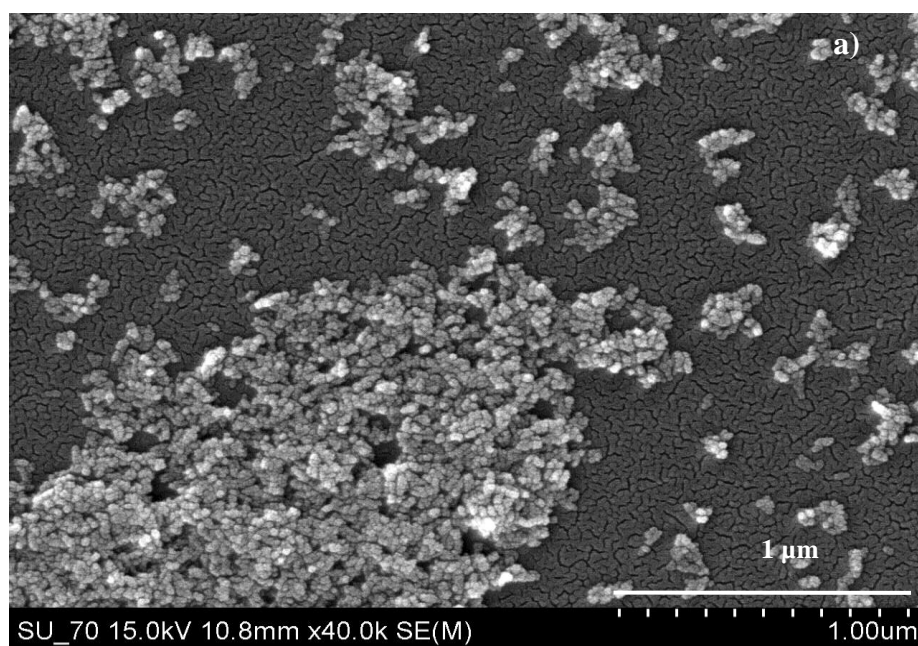


Figura 30 - Micrografia de SEM das partículas da suspensão inicial de HAp.

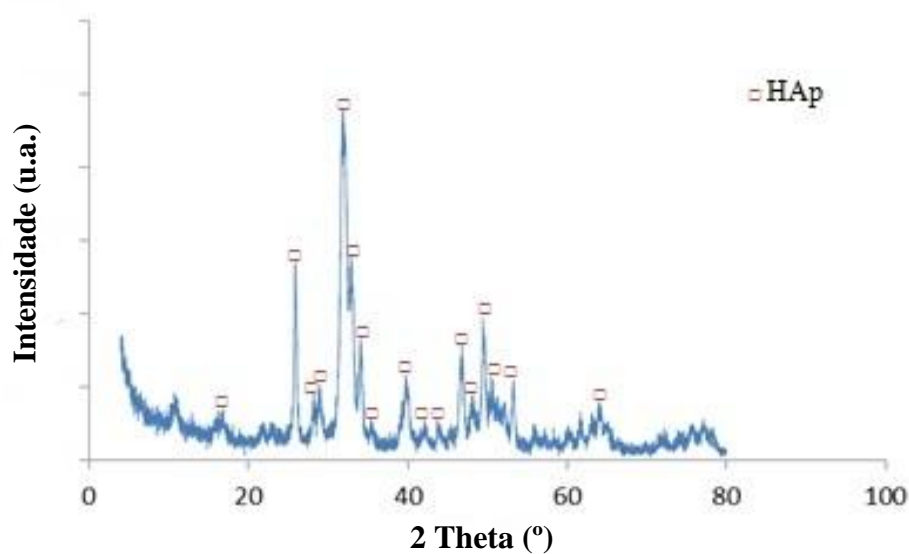


Figura 31 – Difratograma de raio-X das partículas da suspensão inicial de HAp.

Da análise da Figura 30 pode observar-se que as partículas da suspensão inicial são nanométricas, apresentando uma distribuição uniforme. A sua área superficial específica, determinada por BET, é de $124\text{m}^2/\text{g}$ e o tamanho médio de partícula de $0,058\mu\text{m}$.

A análise do difratograma de raio-X das partículas de HAp (Figura 31) revela apenas a presença de picos caraterísticos da HAp, não sendo detetadas outras fases cristalinas.

5.2. Caracterização dos pós atomizados

Como mencionado anteriormente, obtiveram-se por atomização grânulos de HAp, de β -TCP e de misturas dos dois fosfatos de cálcio - grânulos bifásicos (β -TCP/HAp), com diferentes proporções mássicas dos dois fosfatos de cálcio, isto é (50/50) e (70/30). Prepararam-se também grânulos carregados com fármaco, por atomização, que foram alvo de caracterização semelhante à dos grânulos atomizados sem fármaco.

Na Figura 32 apresentam-se os difratogramas de raio-X dos pós atomizados a partir de suspensões de HAp, suspensões de β -TCP e suspensões bifásicas.

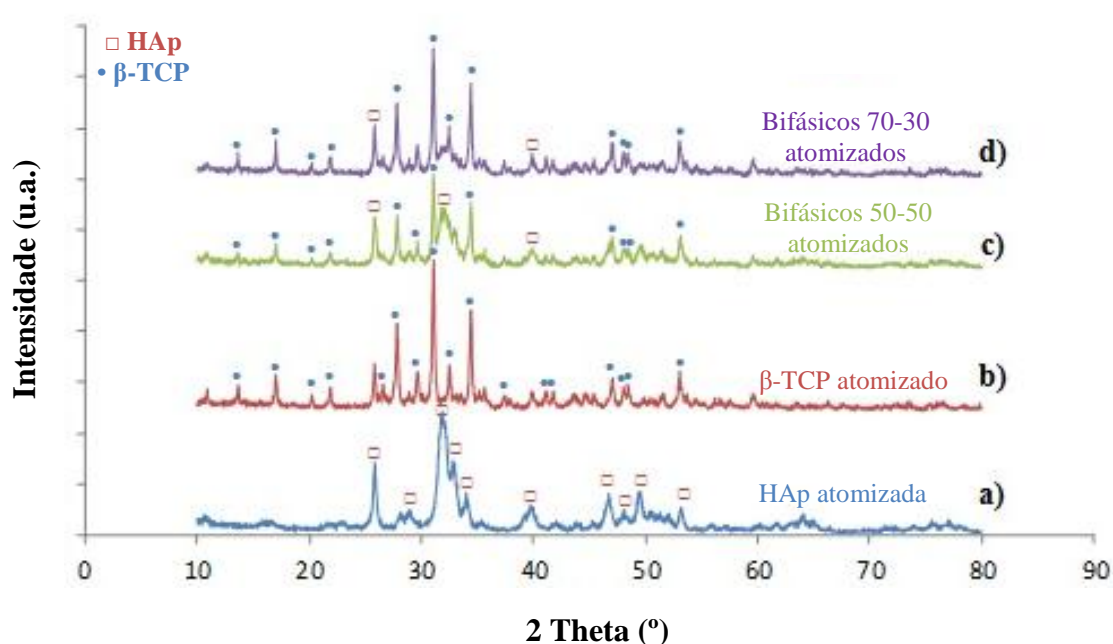


Figura 32 - Difratograma de raio-X dos fosfatos de cálcio atomizados: a) HAp, b) β -TCP, c) bifásicos 50-50 e d) bifásicos 70-30.

A análise da Figura 32 revela que, no caso da HAp atomizada (curva (a)), todos os picos presentes pertencem à HAp, sendo o DRX semelhante ao do pó usado na preparação da suspensão inicial, o que demonstra que a cristalinidade da HAp não é alterada pelo processo de atomização. O mesmo se observa no caso do β -TCP, não se detectando a presença de outras fases cristalinas que não a do próprio β -TCP. Na Figura 32 c) e d) identifica-se apenas a presença de picos pertencentes à HAp e ao β -TCP resultantes da atomização conjunta dos dois materiais, o que denota uma mistura das duas fases, sem outros compostos.

Na Figura 33 pode comparar-se a morfologia do pó de HAp da suspensão inicial com a do pó atomizado.

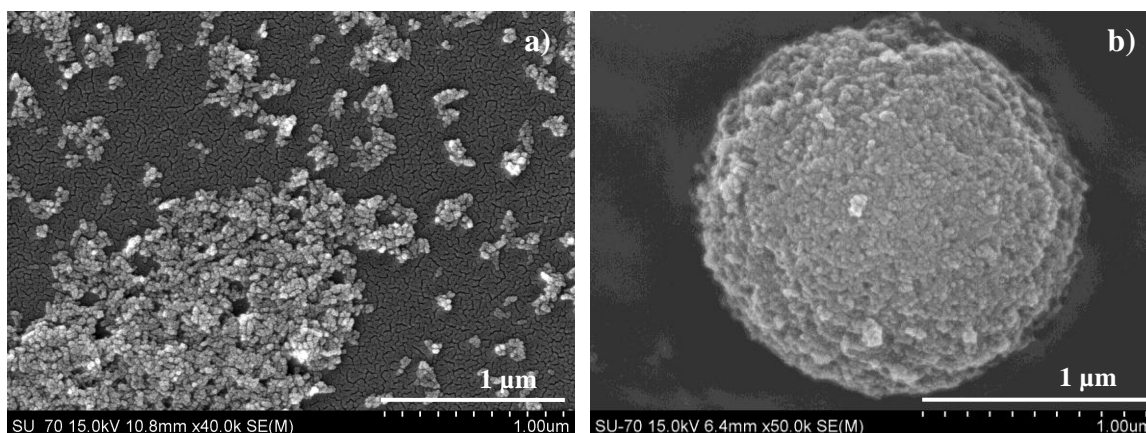


Figura 33 – Micrografias de SEM de HAp: a) partículas iniciais de HAp e b) grânulos de HAp atomizados.

Observa-se que as partículas do pó da suspensão inicial são nanométricas, Figura 33 a), ao passo que o pó atomizado é constituído por grânulos esféricos com um tamanho médio de partícula aproximadamente $3\mu\text{m}$, Figura 33 b). Conclui-se assim que a atomização promoveu a agregação das nanopartículas iniciais, convertendo-as em grânulos micrométricos esféricos. A área superficial específica do pó atomizado ($124\text{m}^2/\text{g}$) é sensivelmente igual à do pó inicial o que indica tratar-se de uma agregação leve, sem perda de superfície.

Na Figura 34 podem observar-se as diferenças de morfologia entre o pó inicial de β -TCP, após 48 horas de moagem e após atomização.

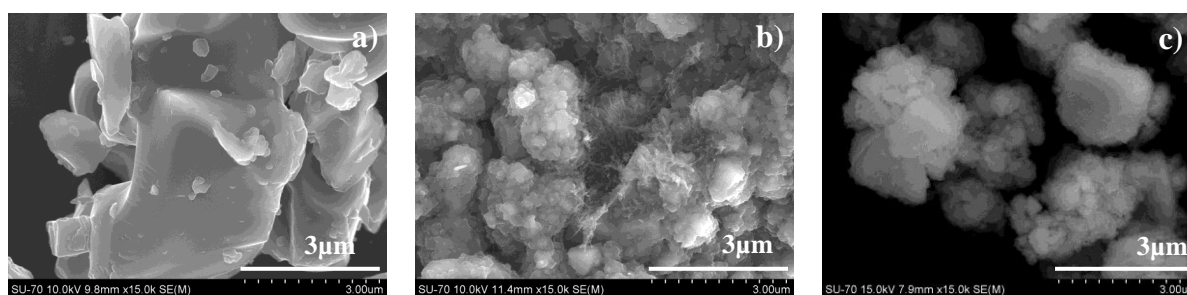


Figura 34 - Micrografias de SEM de a) partículas iniciais de β -TCP, b) β -TCP após 48h de moagem e c) β -TCP após atomização.

Após a atomização, Figura 34 c), observa-se a agregação das partículas, que se apresentam como grânulos irregulares, sensivelmente maiores que as partículas iniciais. A área superficial específica do pó atomizado foi de $16,5\text{m}^2/\text{g}$, significativamente menor do

que a do β -TCP moído ($47,8\text{m}^2/\text{g}$), indicando então uma agregação com perda de superfície.

Na Figura 35 ((a) a (l)) comparam-se as imagens obtidas por SEM dos pós de HAp e das misturas bifásicas de β -TCP/HAp (50/50 e 70/30), após atomização.

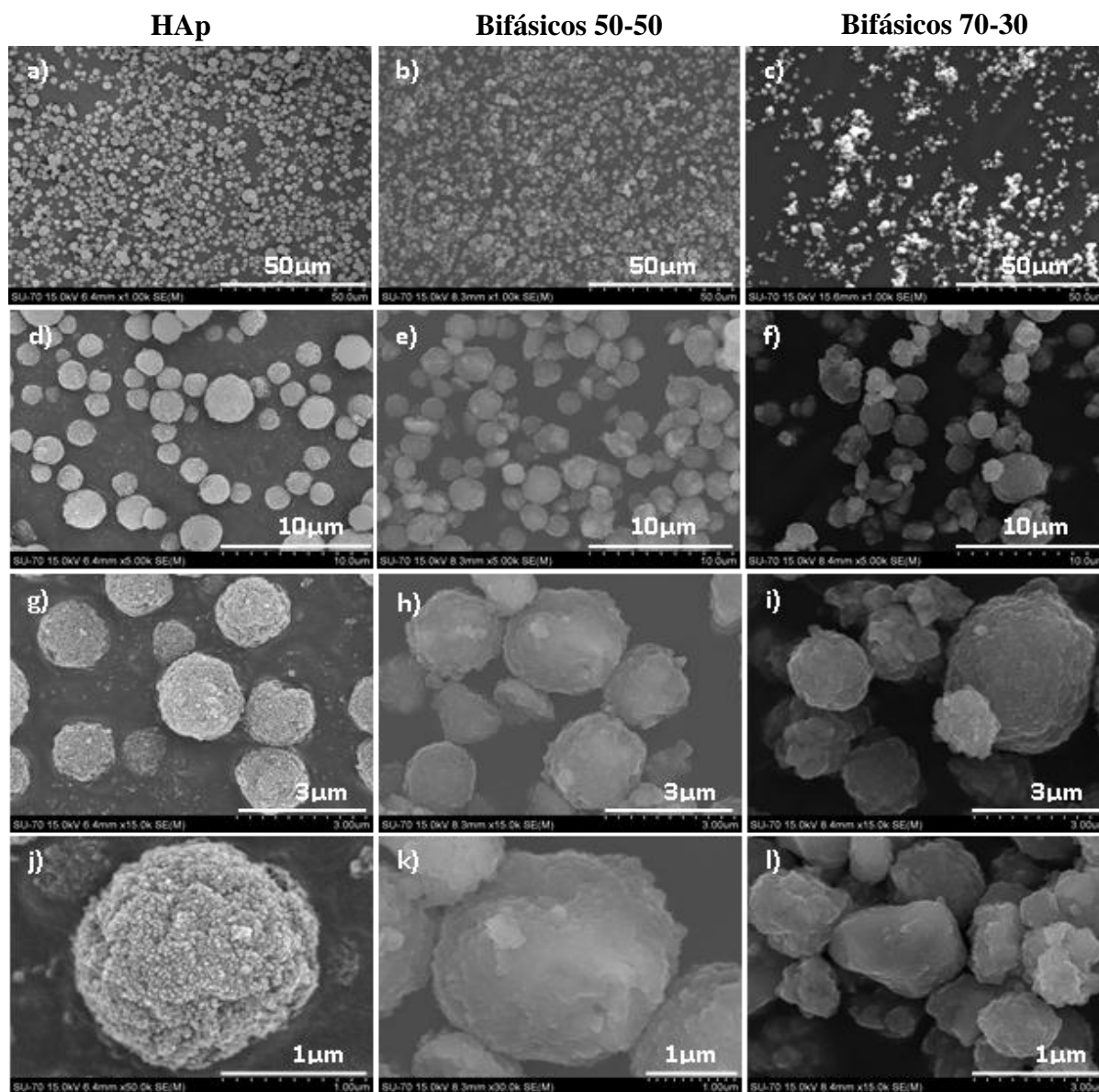


Figura 35 - Micrografias de SEM dos grânulos de hidroxiapatite ((a), d), g) e j)), grânulos bifásicos 50-50 ((b), e), h) e k)) e grânulos bifásicos 70-30((c), f), i) e l)).

As imagens dos três tipos de grânulos (HAp, bifásicos 50-50 e bifásicos 70-30), evidenciam que, em oposição à superfície perfeitamente esférica dos grânulos de HAp (Figura 35 a), d), g) e j)), os grânulos bifásicos 50-50 (Figura 35 b), e), h) e k)) e os bifásicos 70-30 (Figura 35 c), f), i) e l)) apresentam uma superfície irregular, perdendo a esfericidade com o aumento do teor em β -TCP. Tendo em conta que da atomização da HAp inicial resultam grânulos esféricos (Figura 33) e da atomização do β -TCP resultam partículas mais angulosas (Figura 34 c)), é espectável que na atomização conjunta destes dois tipos de materiais se obtenham grânulos com formas irregulares, conforme documentado pela Figura 35 para os grânulos bifásicos. Verifica-se também uma diferença apreciável nos valores das áreas superficiais específicas obtidas por BET, sendo a área superficial dos grânulos de HAp, dos grânulos bifásicos 50-50 e dos grânulos bifásicos 70-30 de $124 \text{ m}^2/\text{g}$, $65,1 \text{ m}^2/\text{g}$ e $38,3 \text{ m}^2/\text{g}$, respetivamente. Com o aumento do teor em β -TCP, os grânulos tornam-se mais pequenos. A área superficial específica dos grânulos diminui à medida que o seu teor em β -TCP aumenta porque, como anteriormente referido, a área específica do β -TCP é consideravelmente inferior à da HAp. Conforme referido na literatura, a morfologia das partículas deve ser selecionada cuidadosamente [5, 13]. No presente trabalho foram obtidas formas esféricas que têm sido recomendadas para evitar processos inflamatórios e melhorar a osteointegração [18, 38].

5.3. Caracterização dos *scaffolds* compósitos

Resultados anteriores [7] permitiram verificar que a incorporação de partículas de HAp na matriz polimérica de CH aumenta a resistência mecânica do *scaffold*. No entanto, os valores mais elevados (0,25 MPa) das resistências mecânicas conseguidas no referido trabalho [7] são ainda relativamente reduzidos para aplicação em regeneração óssea do osso trabecular, por exemplo, que possui uma resistência mecânica à compressão de 4-12MPa. Identificou-se assim a possibilidade de incorporar na matriz polimérica um agente reticulante, o glutaraldeído (GA), para tornar a estrutura mais rígida.

As morfologias dos *scaffolds* de CH e de CH reticulado com GA estão representadas na Figura 36.

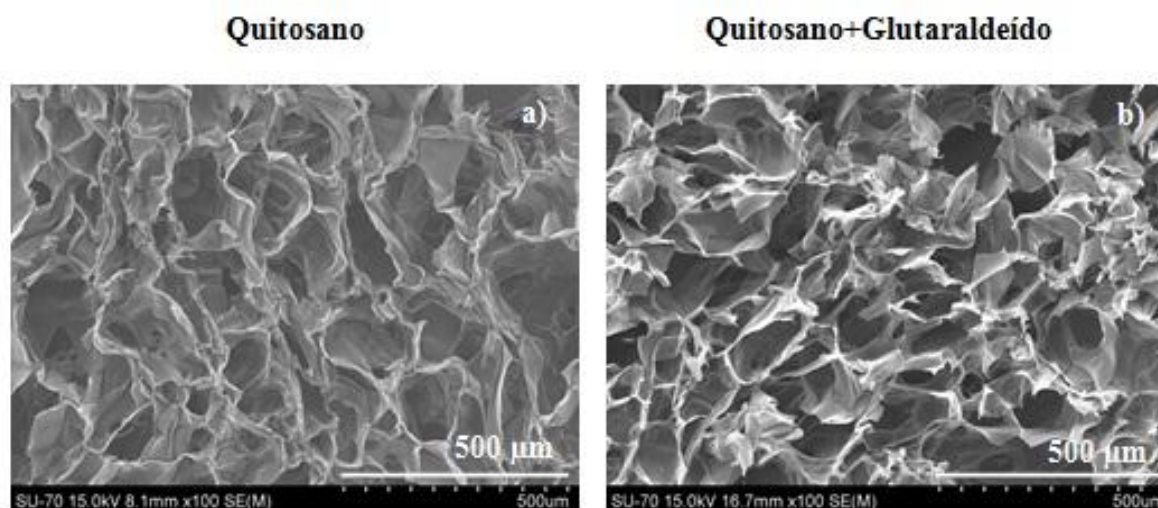


Figura 36 - Micrografias de SEM de *scaffolds* a) de CH puros e b) CH+0,01%GA.

Observa-se que os *scaffolds* de CH (Figura 36 a)) apresentam poros interconectados com um tamanho de poro situado na gama 50 a 250µm que é considerado adequado para a regeneração do osso trabecular [15, 16]. Ao adicionar-se 0,01% de GA não são observadas diferenças morfológicas significativas. Por esta razão e por se encontrar afastada da concentração considerada tóxica (0,6%), esta foi a concentração de GA adotada para a preparação de todos *scaffolds* compósitos de CH+HAp e CH+grânulos bifásicos.

Na Tabela 4 apresenta-se a nomenclatura que se usará para designar os vários tipos de *scaffolds* em análise bem como os materiais utilizados na sua fabricação.

Tabela 4 – Identificação dos *scaffolds* e dos materiais utilizados na respetiva fabricação.

| | Grânulos carregados com DEX | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------|----|-----|-----------------|-----------------|
| | CH | GA | HAp | Bifásicos 50-50 | Bifásicos 70-30 |
| <i>Scaffolds</i> de HAp | ✓ | ✓ | ✓ | | |
| <i>Scaffolds</i> Bifásicos 50-50 | ✓ | ✓ | | ✓ | |
| <i>Scaffolds</i> Bifásicos 70-30 | ✓ | ✓ | | | ✓ |

Na Figura 37 apresentam-se os difratogramas de raio-X dos *scaffolds* compósitos.

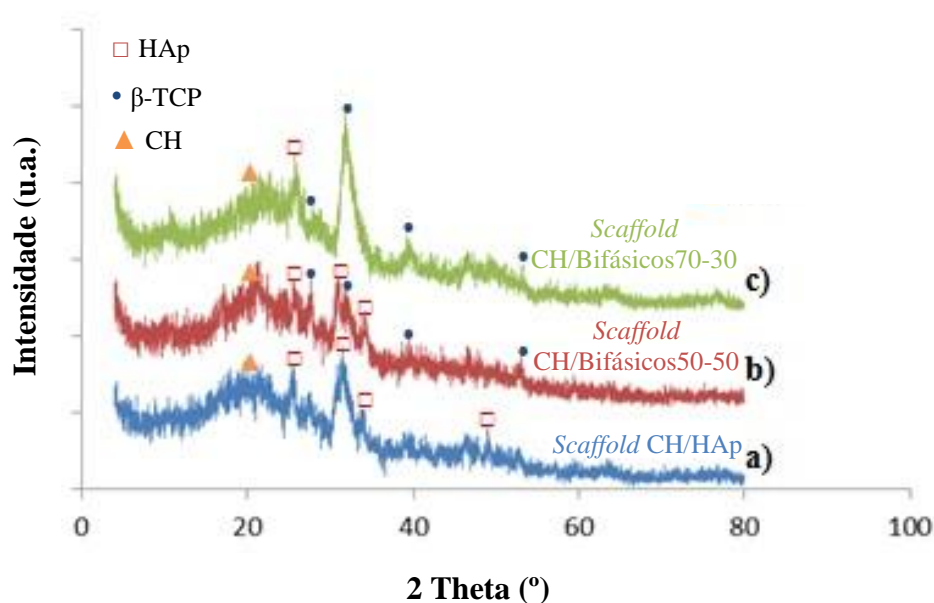


Figura 37 – Difratoograma de raio-X dos *scaffolds* compósitos a) de HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30.

Observam-se, em todos os *scaffolds*, a presença dos picos correspondentes ao CH e aos fosfatos de cálcio presentes nos grânulos atomizados. No caso dos *scaffolds* compósitos de HAp (Figura 37 a)) detetam-se os picos correspondentes ao CH e à HAp. Nos *scaffolds* compósitos Bifásicos (Figura 37 b) e c)) aparecem picos correspondentes ao CH, bem como à HAp e ao β -TCP. Estes resultados indicam que não ocorreu a precipitação de outras fases cristalinas de fosfatos de cálcio durante o processo de preparação dos *scaffolds*.

A Figura 38 evidencia as diferenças morfológicas entre os três tipos de *scaffolds*.

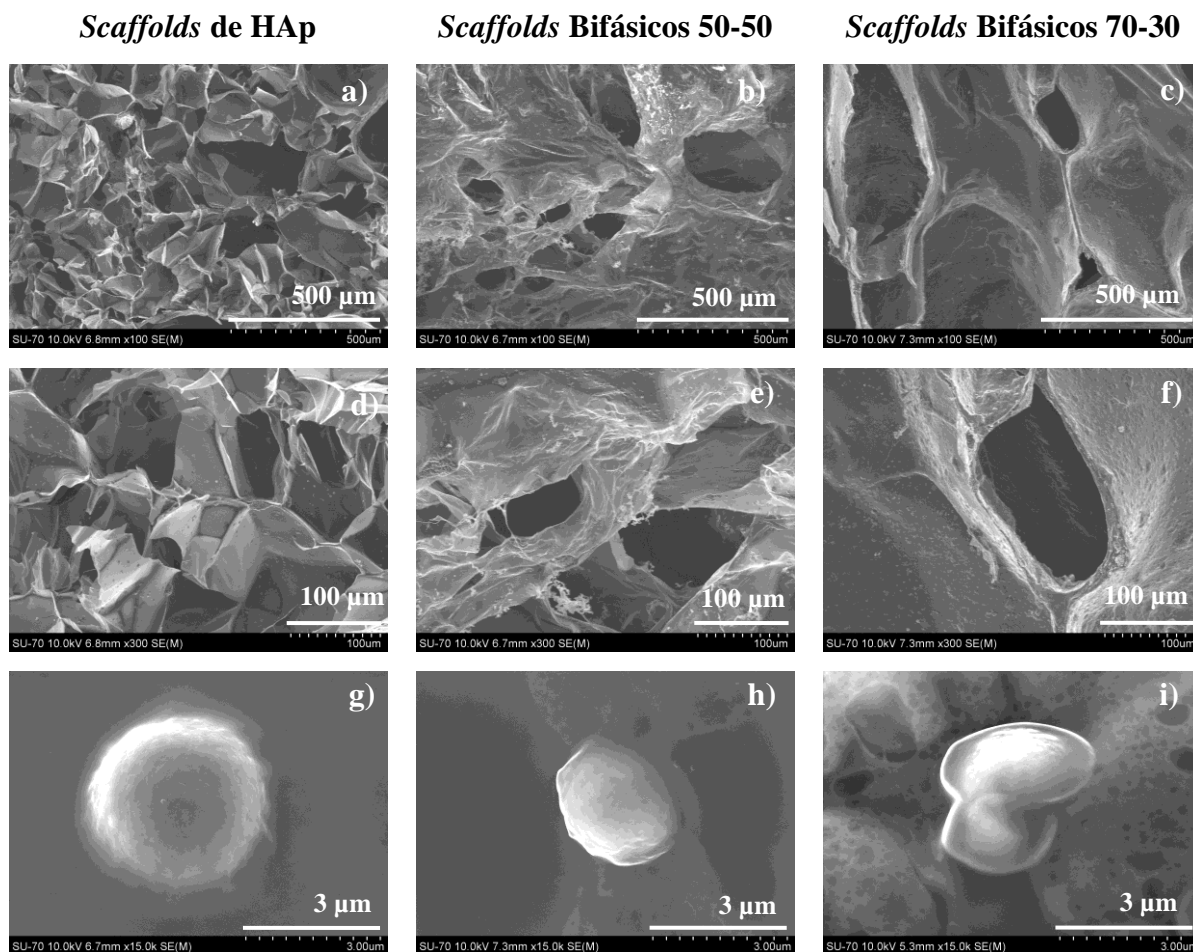


Figura 38 – Micrografias de SEM dos *scaffolds* compósitos de CH e grânulos de fosfatos de cálcio: grânulos de HAp ((a), d), e g)), grânulos bifásicos 50-50 ((b), e) e h)) e grânulos bifásicos 70-30((c), f) e i)).

Verifica-se que todos os *scaffolds* apresentam poros interconectados, com um tamanho de poro na gama 50 a 500μm, tamanho considerado apropriado para promover o crescimento celular e a circulação de nutrientes [15, 16]. No entanto a espessura de parede parece aumentar com a incorporação dos grânulos bifásicos. Todos os *scaffolds* apresentaram valores de porosidade superior a 75%, sendo os de HAp os mais porosos (88%) e consequentemente os menos densos (0,06 g/cm³) seguindo-se os bifásicos 50-50 (86% de porosidade e 0,07g/cm³) e por último os bifásicos 70-30 (75% de porosidade e 0,09g/cm³). Estes valores de porosidade permitem ao *scaffold* mimetizar a estrutura porosa do osso trabecular que varia entre 30 a 90% de porosidade [16].

Na estrutura da parede de poro dos *scaffolds* compósitos também é possível observar a presença dos grânulos de HAp (Figura 39 a)) e bifásicos (Figura 39 b) e c)) que se apresentam distribuídos uniformemente por toda a matriz polimérica de quitosano.

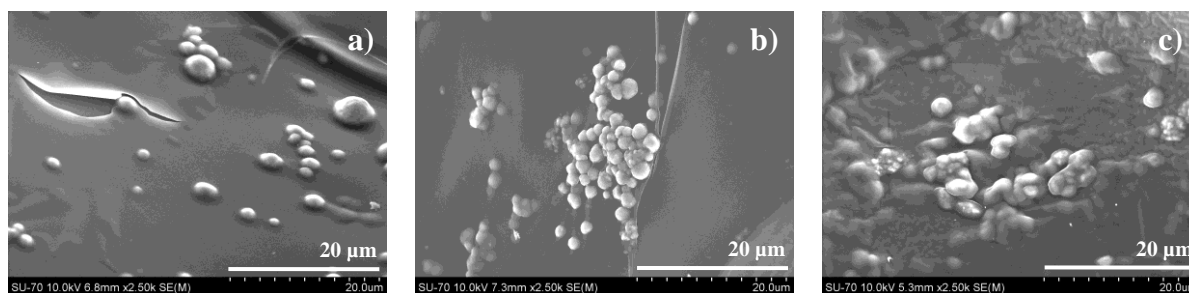


Figura 39 – Micrografias de SEM da parede de poro dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30.

Os espectros de infravermelho dos *scaffolds* compósitos estão representados na Figura 40. As bandas de absorção mais importantes nos *scaffolds* compósitos estão identificadas na Tabela 5. As bandas a 3450 , 1650 , 1590 e 1420cm^{-1} , presentes em todos os tipos de *scaffolds*, denunciam os modos de vibração correspondentes ao CH e as bandas 472 , 575 , 601 , 956 , 1024 - 1095cm^{-1} ao grupo ortofosfato (PO_4^{3-}) presente nas partículas de HAp [87]. Também é possível constatar a presença de uma banda correspondente à ligação P-O da vibração do grupo HPO_4^{2-} a 948cm^{-1} e uma outra banda a 970cm^{-1} pertencente à ligação P-OH correspondente à vibração do grupo PO_4 da estrutura cristalina do β -TCP [87, 88]. Para além destas bandas, existem outras correspondentes ao β -TCP reportadas na literatura (1120 , 1042 , 604 e 433cm^{-1}) [89] mas que não aparecem definidas nos espectros de FTIR da Figura 40 pois encontram-se sobrepostas por outras mais intensas. Observa-se ainda uma banda larga entre 3200 e 3700cm^{-1} associada à vibração dos grupos hidroxilo (OH). A banda 2349cm^{-1} deve-se ao CO_2 atmosférico [88]. Podem ainda identificar-se picos característicos da DEX (O FTIR da DEX apresenta-se em anexo) a 900 e 1650cm^{-1} [10] o que confirma a presença do fármaco nas matrizes.

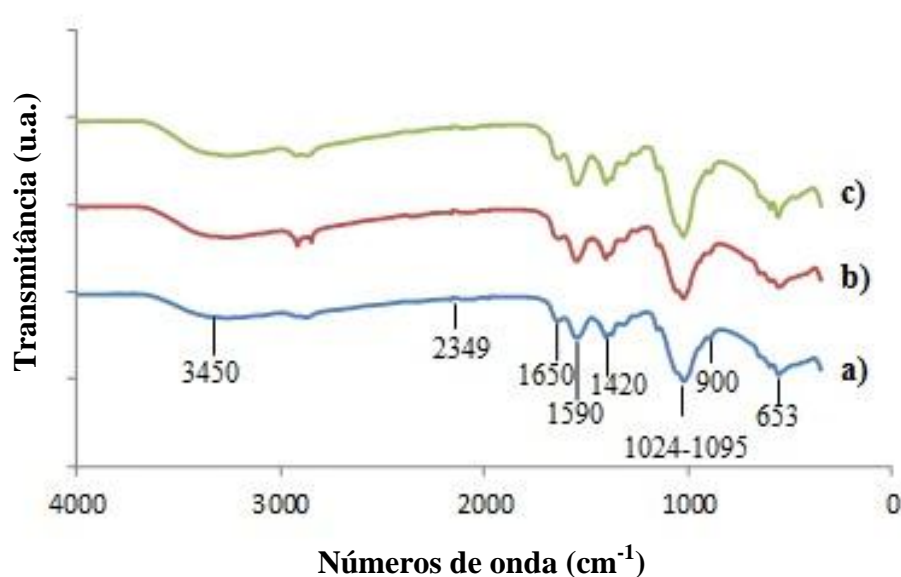


Figura 40 – Espectros de FTIR dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30.

Tabela 5 - Bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros apresentados na Figura 40.

| Bandas de adsorção no Infravermelho (cm ⁻¹) | Descrição | |
|---|-------------------|--|
| ~3450 | Alongamento N-H | CH |
| ~1650 | Alongamento -C=O- | CH |
| ~1590 | Amina | CH |
| ~1420 | Flexão C-H | CH |
| ~1024-1095 | Alongamento P-O | PO ₄ ³⁻ (HAp) |
| ~956 | Alongamento P-O | PO ₄ ³⁻ (HAp) |
| ~653 | Flexão O-H | HAp |

Da análise efetuada pode concluir-se que o espectro de FTIR dos *scaffolds* compósitos confirmou a presença de grupos funcionais caraterísticos do CH, HAp, β -TCP e da DEX.

5.3.1. Propriedades mecânicas

O comportamento mecânico dos *scaffolds* durante o ensaio de compressão pode ser ilustrado pelas curvas tensão-deformação que se apresentam na Figura 41.

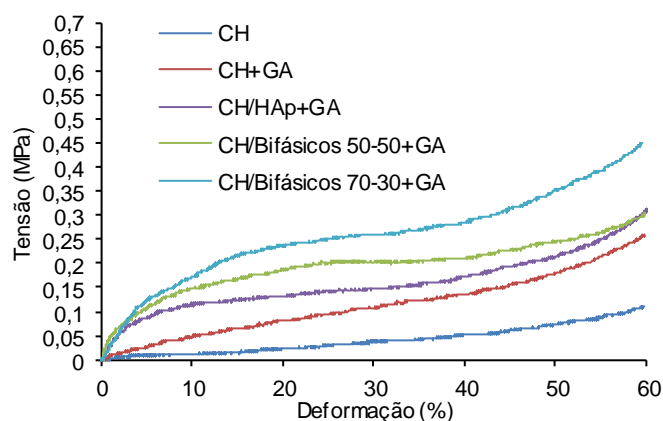


Figura 41 – Comportamento mecânico dos diferentes *scaffolds* compósito de CH/HAp+GA, CH/Bifásicos 50-50+GA e CH/Bifásicos 70-30+GA. Para efeitos de comparação estão também ilustrados os comportamentos dos *scaffolds* de quitosano e de (quitosano+glutaraldeído).

Pela análise da Figura 41 conclui-se que quando se comparam os *scaffolds* com e sem agente de reticulação, o *scaffold* com glutaraldeído (GA) é o que apresenta melhores propriedades mecânicas. O GA reage com os dois grupos amina do CH formando ligações covalentes (bases de Schiff) entre estes (Figura 42), o que contribui para tornar a estrutura mais rígida e mecanicamente mais resistente.

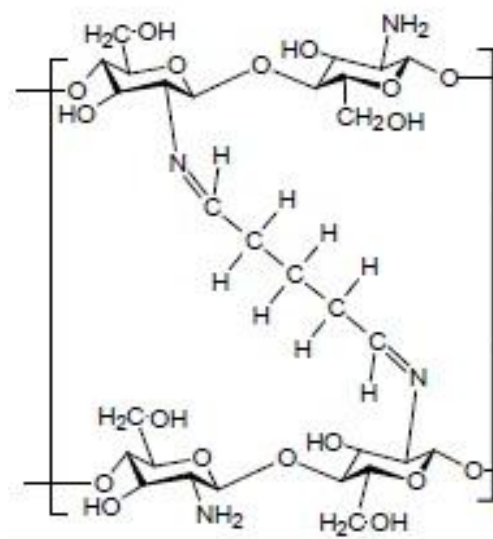


Figura 42 - Reticulação do quitosano com o glutaraldeído com formação da base de Schiff. Adaptado de [90].

Observa-se também que, com a incorporação dos grânulos de fosfato de cálcio, as propriedades mecânicas melhoram. Os *scaffolds* com maior teor em β -TCP (*scaffolds*

compósitos de CH/Bifásicos 70-30) apresentam resistência mecânica superior, aumentando a resistência de compressão de 0,11 (*scaffold* de quitosano) para 0,45MPa e o módulo de Young de 0,27 (*scaffold* de quitosano) para 2,79MPa. Neste trabalho, como já referido, verificou-se que o aumento do teor em β -TCP induz uma diminuição da porosidade e por conseguinte um aumento da densidade o que contribui para a melhoria das propriedades mecânicas, explicando assim o incremento da resistência à compressão e do módulo de Young com o aumento do teor em β -TCP. Apesar dos valores medidos serem inferiores aos referidos para o osso trabecular, nomeadamente entre 50 a 500MPa para o módulo de Young e 4 a 12 MPa para a resistência de compressão [15-17], os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos reportados na literatura, particularmente para *scaffolds* preparados por métodos semelhantes aos usados no presente trabalho. Zhang *et al* [62] produziram, em condições comparáveis às do presente estudo (2% de CH em 0,2M de ácido acético), *scaffolds* de CH reforçados com β -TCP obtendo valores de resistência à compressão na ordem dos 0,11MPa para *scaffolds* apenas de CH, tal como no presente trabalho. Verificaram também que ao incorporar β -TCP nos *scaffolds* as propriedades foram melhoradas, sendo os melhores valores de resistência à compressão (0,4 MPa) observados em *scaffolds* produzidos com razão mássica de CH/ β -TCP de [3/7] valores semelhantes aos observados no presente estudo (0,45MPa), nos *scaffolds* (70/30). Estes resultados sugerem que, aumentando o teor em β -TCP dos presentes *scaffolds*, se poderá ainda incrementar a sua resistência à compressão. Deverá no entanto ter-se em consideração a redução de porosidade que acompanhará este efeito pelo que a solução ótima implicará sempre uma situação de compromisso.

5.4. Libertação da DEX

5.4.1. Grânulos e *scaffolds* compósitos

Os resultados obtidos no estudo da libertação do fármaco a partir dos grânulos atomizados estão representados na Figura 43, quer expressos em termos de massa de fármaco libertado por unidade de massa de grânulos (Figura 43 a)) quer em termos da percentagem de fármaco libertado (calculada como: $[(\text{massa de fármaco libertada})/(\text{massa de fármaco inicialmente carregada nos grânulos})] \times 100$) (Figura 43 b)). A carga inicial de fármaco nos grânulos foi de 0,09 mg de DEX/mg de grânulo. Os ensaios de libertação foram conduzidos numa solução tampão de fosfatos a 37,4°C e a pH 7,4.

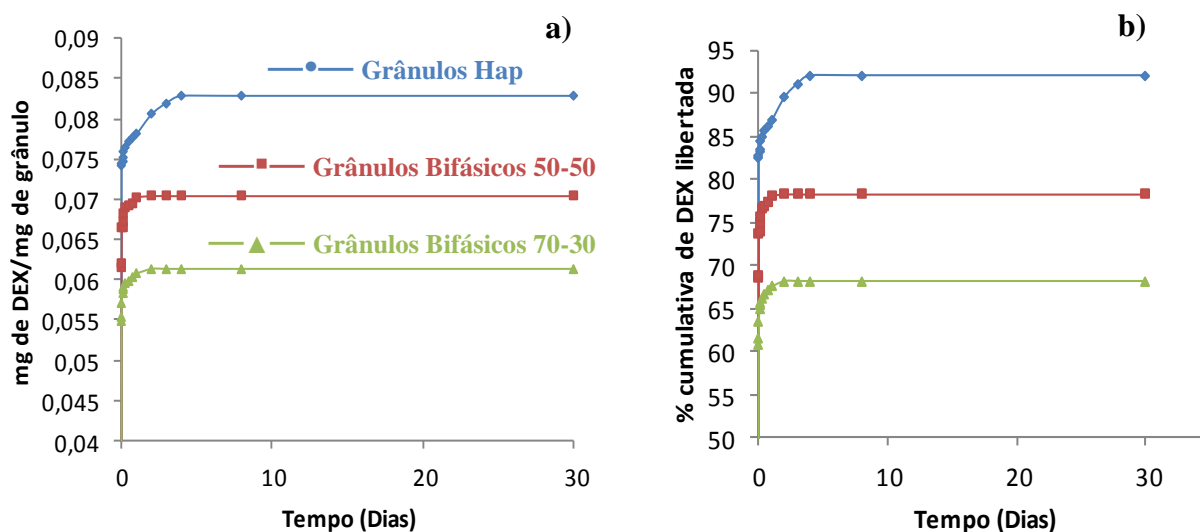


Figura 43 – Perfil de liberação da DEX a partir dos grânulos (—●—) de HAp, (—■—) Bifásicos 50-50 e (—▲—) Bifásicos 70-30 baseado em a) quantidade absoluta de fármaco libertado e b) percentagem de fármaco libertado.

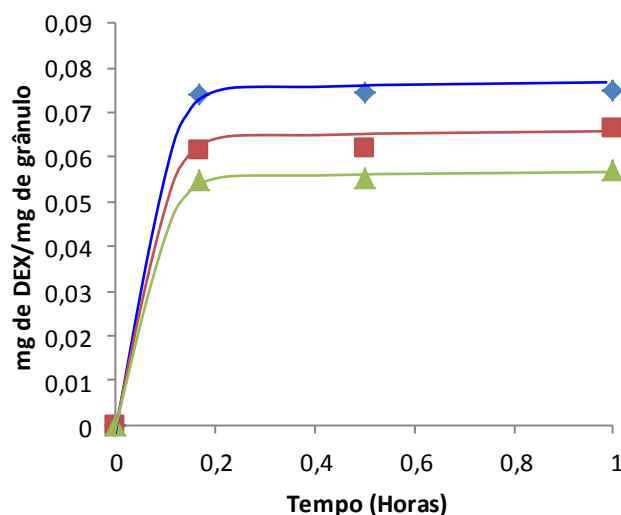


Figura 44 - Ampliação da Figura 43 a) para um tempo de liberação mais curto ($t \leq 1h$).

As curvas obtidas evidenciaram uma liberação da DEX muito rápida no período inicial. Após este período, a velocidade de liberação retarda e, em todos os casos, ao fim de 1 dia não se observam alterações significativas na quantidade de fármaco acumulado em solução. A comparação dos perfis de liberação dos vários tipos de grânulos mostra claramente que a quantidade de fármaco libertada nos grânulos de HAp é superior à dos

grânulos bifásicos: ao fim de 10 minutos, aproximadamente 83%, 69% e 61% do fármaco carregado nos grânulos de HAp, bifásicos 50-50 e bifásicos 70-30 respectivamente, já foi libertado e, uma vez estabilizada a libertação, os grânulos de HAp são os que libertam maiores quantidades de fármaco (92%) seguindo-se-lhes os grânulos bifásicos 50-50 (78%) e por fim os bifásicos 70-30 (68%).

Pode-se então concluir que todos os tipos de grânulos estudados libertam a DEX rapidamente numa fase inicial permitindo a obtenção de concentrações elevadas de fármaco nos primeiros 10 minutos. O seu uso em terapêutica prolongada não é porém aconselhado dado que, a partir de um período inicial de 1 hora não se observa um progresso efetivo na libertação do fármaco.

A literatura reporta alguns estudos relativos à atomização de grânulos de HAp com fármaco que podem ser utilizados simultaneamente para matrizes libertadoras de fármaco e regeneração óssea. Santos *et al* [91] prepararam grânulos de HAp com o fármaco 5-Fluorouracil verificando que ao fim de 5min o perfil de libertação do fármaco estabiliza e alcança um valor muito próximo da quantidade inicial de fármaco carregado. Comparando esses resultados com os presentes constata-se que em ambos os casos a libertação inicial é de facto muito rápida embora a quantidade libertada seja condicionada pelo tipo de fosfato usado como suporte do fármaco.

Comparando as Figuras 35 e 45 é possível avaliar as alterações de morfologia dos grânulos ocorridas durante a libertação da DEX. Observa-se que no caso dos grânulos bifásicos existe uma tendência para aumento do tamanho médio de grânulo após 8 dias de libertação, que é mais acentuada no caso da composição 70/30 (comparar Figura 35(1) e Figura 45(1)). Este comportamento pode resultar de fenómenos de dissolução/reprecipitação que podem contribuir para o aumento de dimensão dos grânulos. Atendendo a que o β -TCP é mais solúvel do que a HAp, é espectável que a dissolução ocorra em maior extensão no caso dos grânulos 70/30. Uma das consequências deste comportamento pode ser a formação de uma camada superficial de precipitado nos grânulos que se comporte como barreira à difusão da DEX para o meio exterior de libertação, o que pode explicar a diminuição da quantidade de DEX libertada no caso dos grânulos bifásicos (maior em grânulos 70/30 do que nos grânulos 50/50) quando comparados com a HAp (Figura 43 e 44). No caso dos grânulos de HAp, as variações de dimensão dos grânulos são pouco evidentes

embora seja claramente visível a formação de colos entre grânulos adjacentes (Figura 45 g) e j), o que indica também alguma dissolução no caso da HAp.

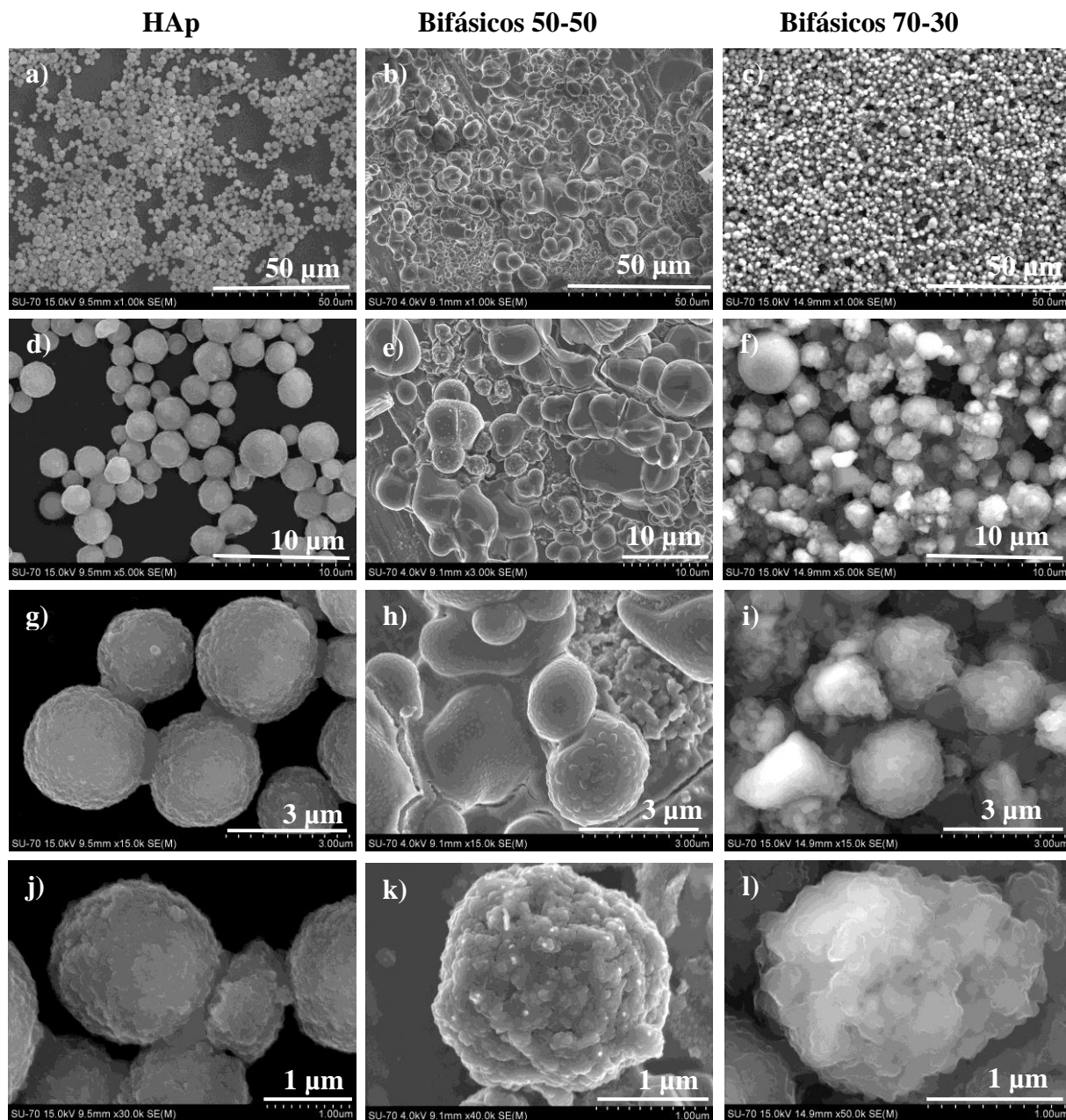


Figura 45 – Micrografias de SEM dos grânulos de a), d), g) e j) hidroxiapatite, b), e), h) e k) bifásicos 50-50 e c), f), i) e l) bifásicos 70-30 após 8 dias de liberação da DEX em PBS.

Os perfis de liberação da DEX em soluções de PBS a partir de diferentes *scaffolds* compósitos foram seguidos durante 30 dias e estão representados na Figura 46. Nesta figura, são apresentados dois tipos de curvas: (1) percentagem cumulativa de DEX libertada (a) e (2) quantidade absoluta de fármaco libertado (b). A Figura 47 representa uma ampliação do perfil de liberação para um tempo mais curto.

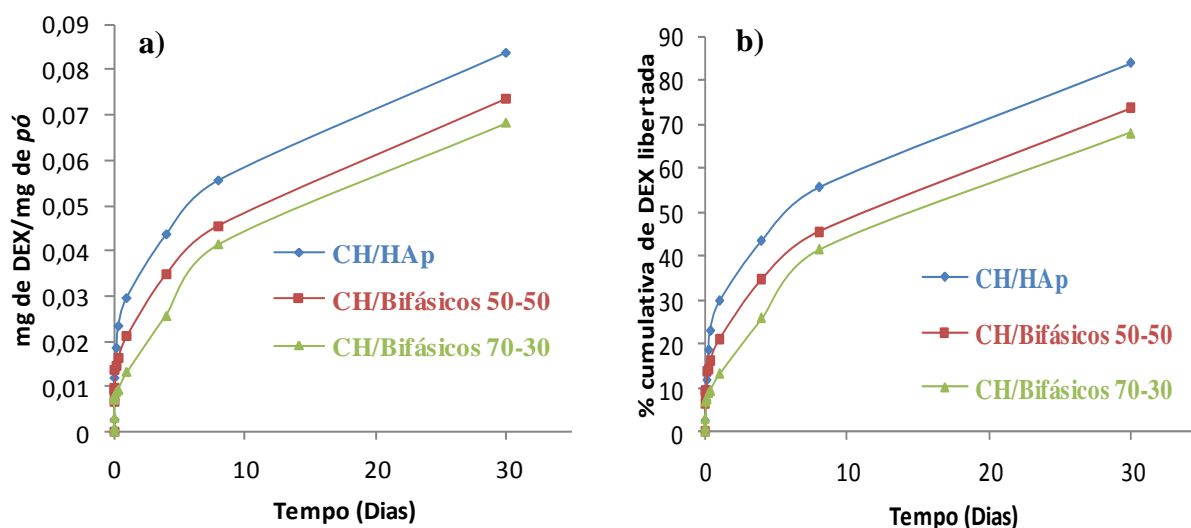


Figura 46 - Perfil de liberação da DEX, nos *scaffolds* compósitos, baseado em a) quantidade absoluta de fármaco libertado e b) percentagem cumulativa de liberação.

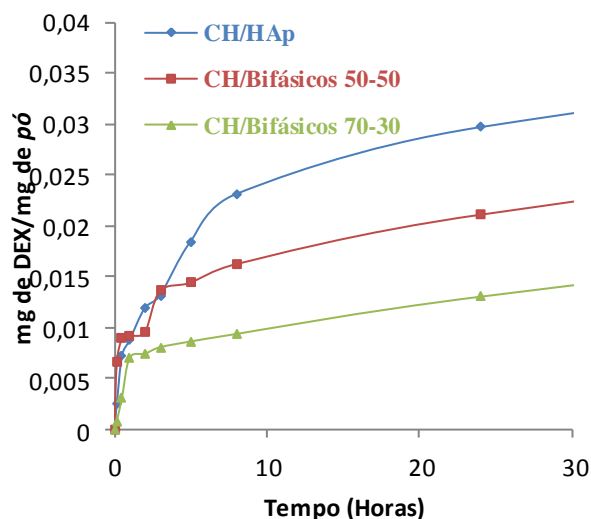


Figura 47 - Ampliação da Figura 46 a) para um tempo de liberação mais curto ($t \leq 30 \text{ min}$).

Os resultados demonstram claramente que o padrão de liberação depende do tipo de grânulos incorporados nos *scaffolds*. Observa-se que, após incorporação dos grânulos carregados com a DEX no quitosano, a liberação é significativamente retardada. Ao incorporar a DEX em grânulos, o fármaco vai encontrar-se num local de acesso mais difícil em relação ao meio de liberação do que se tivesse sido incorporado apenas na matriz do polímero. O fármaco tem agora de difundir através dos grânulos e depois através da matriz polimérica antes de chegar ao meio de liberação.

Pode observar-se que, em todos os tipos de *scaffolds*, uma explosão de liberação inicial ocorre durante as primeiras 10 horas o que sugere que os *scaffolds* possuem uma certa quantidade de fármaco localizada perto da superfície. Comportamentos semelhantes foram reportados por Duarte *et al* [9] e por Zhang *et al* [47] para *scaffolds* de CH carregados com DEX e com antibiótico, respetivamente. No primeiro caso observou-se uma rápida liberação inicial do fármaco ao fim de 2 horas e no 2º caso cerca de 80% do antibiótico foi libertado ao fim de 2 dias. Neste último caso o *scaffold* de CH foi reforçado com β -TCP e vidro, concluindo-se pois que a velocidade inicial de liberação é naturalmente condicionada pelo tipo de componentes do *scaffold*.

Para tempos de liberação mais longos, verifica-se que nos *scaffolds* compósitos de HAp há uma liberação de DEX mais rápida do que nos *scaffolds* compósitos Bifásicos 50-50 e Bifásicos 70-30, libertando ao fim de 30 dias cerca de 78, 69 e 65% de fármaco, respetivamente. Observa-se também que os *scaffolds* apresentam perfis de liberação diferentes durante as primeiras 10 horas, mostrando a partir daí um comportamento paralelo.

O perfil de liberação de qualquer tipo de sistema de liberação depende de vários fatores, como a microestrutura do sistema, a solubilidade do fármaco, o tipo de ligação entre o fármaco e a matriz e o mecanismo de liberação a partir da matriz (se existente) [92]. Como referido anteriormente, do ponto de vista das matrizes poliméricas, três possíveis mecanismos podem contribuir para a liberação do fármaco: difusão controlada, *swelling* ou intumescimento controlado osmoticamente e biodegradabilidade/erosão (controlada quimicamente).

De uma forma geral, as matrizes intumescíveis (caso das matrizes de CH) são ativadas pela água, e a liberação de fármacos a partir de sistemas farmacêuticos deste tipo é controlada por interações entre a solução de liberação, o polímero e o fármaco.

A penetração da água no sistema matricial, sobretudo através dos poros é o primeiro passo do processo de intumescimento do polímero e consequentemente do processo de dissolução do fármaco. A água que penetra no sistema preenche os espaços entre as cadeias poliméricas e difunde lentamente para as regiões mais densas do CH (onde a mobilidade macromolecular é muito baixa e conduz por isso a baixas taxas de difusão de água), “forçando” as restantes cadeias do CH a separarem-se. Consequentemente, as cadeias ganham liberdade rotacional e começam a ocupar mais espaço, ficando num novo estado solvatado. O aumento da mobilidade das cadeias poliméricas facilita a erosão e assim favorece o transporte da DEX, resultando então numa libertação inicial muito rápida (ao fim de 10 horas). À medida que o núcleo seco fica hidratado a camada exterior gelificada continua a sofrer erosão. Estes dois fenómenos ocorrem simultaneamente e o sistema matricial mantém um volume mais ou menos constante Figura 14 (3 e 4) libertando assim lentamente a DEX ao longo dos restantes dias. Quando a penetração da água na matriz gelificada excede um valor crítico de concentração (concentração na qual as interações entre a água e o CH aumentam com consequente redução das interações CH - CH), as cadeias poliméricas começam a separar-se, alargando os espaços onde a difusão da DEX ocorre. Nesta fase, a taxa de hidratação diminui relativamente à taxa de erosão, Figura 14 (5). As cadeias poliméricas dispersam-se na camada mais externa, resultando num aumento da taxa de erosão. Em consequência do aumento da distância entre as cadeias poliméricas, estas deixam de estar interligadas entre si, separando-se com subsequente desintegração total do sistema e libertação da DEX restante.

A erosão/degradação dos *scaffolds* são visíveis nas imagens obtidas por SEM que se apresentam na Figura 48.

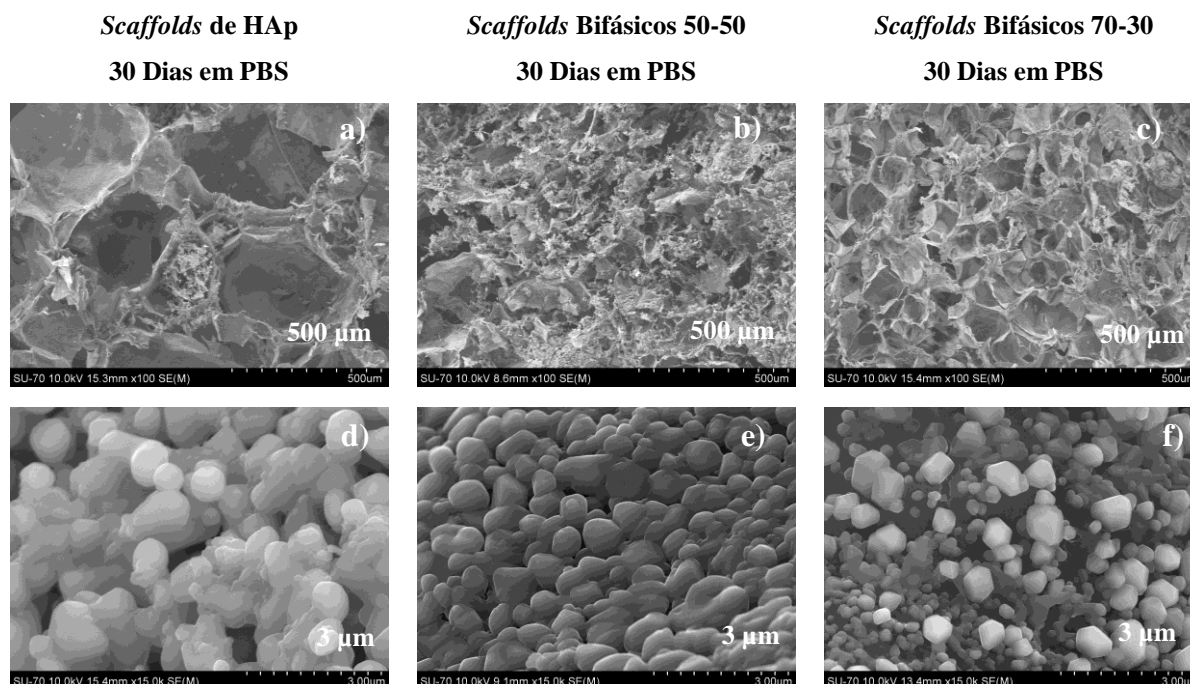


Figura 48 – Micrografias de SEM dos *scaffolds* compósitos de a) e d) HAp, b) e e) Bifásicos 50-50 e c) e f) Bifásicos 70-30 após 30 dias de liberação em PBS.

Comparando as microfotografias dos *scaffolds* compósitos antes da liberação em PBS (Figura 38) com as apresentadas na Figura 48, observa-se que, ao fim de 30 dias, os *scaffolds* apresentam degradação superficial confirmando assim que, além da difusão do fármaco através da matriz, a biodegradabilidade do CH poderá ter contribuído também para o transporte do fármaco para o meio de liberação. Para ampliações maiores observa-se também que são bem visíveis os grânulos na parede de poro (Figura 48 (d) e (e)). Estes, ao fim de 30 dias apresentam-se com tamanhos inferiores aos dos grânulos observados antes da imersão dos *scaffolds* em PBS, Figura 38. Estas observações sugerem a ocorrência da degradação da matriz polimérica e possivelmente a dissolução de grânulos durante a liberação do fármaco a partir dos *scaffolds*. Observou-se também a ocorrência de cristais bem facetados, ilustrados na (Figura 48 (f)), atribuídos a precipitados com morfologia distinta da dos grânulos de fosfatos de cálcio.

Na Figura 49 apresenta-se a evolução das fases cristalinas após 30 dias de liberação. Na Figura 50 estão representadas ampliações da Figura 49 (a e b).

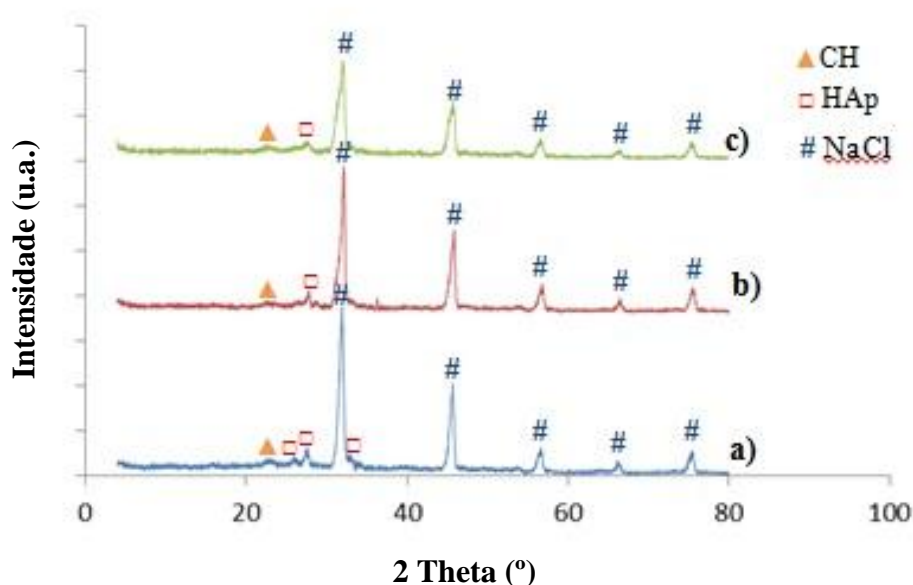


Figura 49 – Difratoograma de raio-X dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após 30 dias de liberação em PBS.

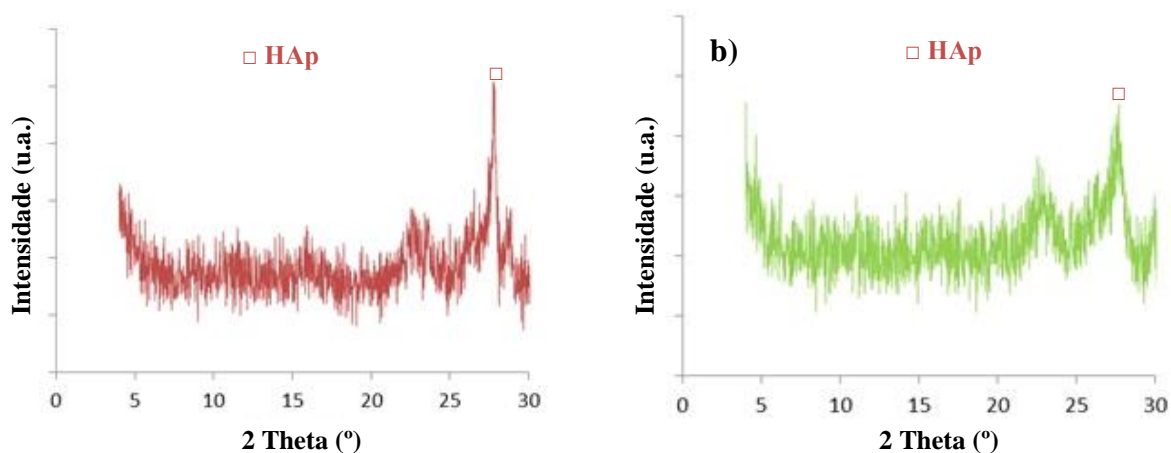


Figura 50 - Ampliação do difratograma de raio-X da Figura 49 b) e c).

O espectro de DRX evidencia a existência de HAp em todos os tipos de *scaffolds* (Figura 49). Não se identificam os picos referentes ao β -TCP nos *scaffolds* compósitos bifásicos (Figura 50) o que indica a sua dissolução e possível recristalização como outro tipo de CaP, possivelmente de baixa cristalinidade ou amorfo. Além da presença de HAp verifica-se também a do CH, o que confirma a sua não total degradação, e picos muito estreitos e intensos correspondentes a NaCl que precipitou do meio salino utilizado na liberação, sugerindo-se que os cristais facetados acima referidos correspondam a esta fase

cristalina. Apesar dos procedimentos de lavagem repetidos, alguns cristais de NaCl ainda persistiram. Estes resultados estão em linha com as observações referidas anteriormente.

Na Figura 51 apresenta-se o espectro de infravermelho dos *scaffolds* compósitos

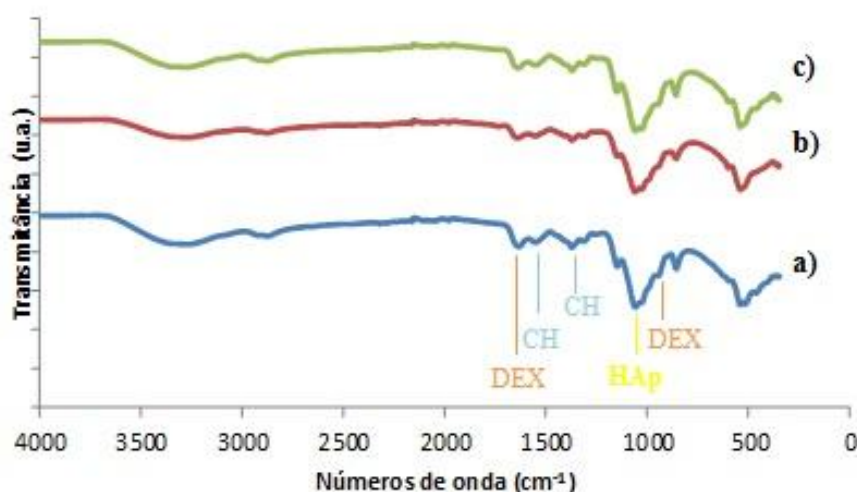


Figura 51 - Espectro FTIR dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-5 e c) Bifásicos 70-30 após 30 dias de libertação do fármaco (DEX) em PBS.

Todos os *scaffolds* apresentam comportamento semelhante após 30 dias de libertação, diferenciando-se dos *scaffolds* compósitos antes da imersão em PBS (Figura 40) fundamentalmente nas gamas 1590 a 1420cm⁻¹ onde se identificam bandas de absorção correspondentes ao CH e na gama 1024-1095cm⁻¹ onde se detetam as bandas correspondentes à HAp. Estas bandas aparecem menos intensas refletindo não só a degradação do CH mas também a dos grânulos de CaP. A persistência das bandas a 1650 e 900 cm⁻¹, embora menos intensas confirmam a presença de alguma DEX após os 30 dias de libertação, o que está de acordo com os resultados de libertação do fármaco que evidenciaram que ao fim deste tempo o fármaco ainda não foi totalmente libertado.

5.4.2. Captação de água e degradação

Depois da implantação no corpo humano, os biomateriais interagem com os fluidos circundantes absorvendo em primeiro lugar a água, que inicia o processo de degradação. A absorção de água faz com que o material se torne mais flexível causando mudanças dimensionais. Além do mais, uma captação de água elevada, normalmente, acelera o

processo de hidrólise. Os resultados de captação de água e degradação ao fim de 30 dias estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Captação de água e degradação dos *scaffolds* compósitos após 30 dias de libertação em PBS.

| | <i>Scaffolds</i> de HAp | <i>Scaffolds</i> bifásicos 50-50 | <i>Scaffolds</i> bifásicos 70-30 |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Captação de água (%) | 2110 | 1991 | 1797 |
| Perda de peso (%) | 55 | 75 | 79 |

A porosidade dos *scaffolds* tem uma forte influência na retenção de água, o que vai influenciar o comportamento de degradação. Como referido anteriormente, os *scaffolds* de HAp apresentam valores de porosidade superiores aos *scaffolds* bifásicos e são também os que captam maiores quantidades de água. A difusão da água para o interior da estrutura enfraquece-a e torna-a mais suscetível à degradação, o que sugere que a matriz polimérica dos *scaffolds* de HAp se degrade mais rapidamente. No entanto, como o β -TCP é uma fase mais solúvel do que a HAp, a sua dissolução contribuirá para uma maior perda de peso dos *scaffolds* com maior teor em β -TCP se não for compensada com reprecipitação de fosfato de cálcio como parece ser o caso.

5.5. Bioatividade

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a dissolução da HAp no corpo humano após implantação é muito baixa quando o objetivo é alcançar a formação perfeita do tecido ósseo [93]. Por outro lado, o β -TCP apresenta uma rápida libertação de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} quando exposto aos líquidos fisiológicos. Este perfil de rápida dissolução reduz a área superficial útil para a formação do osso, tornando-se uma limitação para a aplicação clínica. Assim a bioreabsorbilidade adequada é identificada quando se utilizam composições bifásicas.

No presente trabalho seguiram-se as variações da concentração de cálcio e de fósforo no meio de imersão (SBF) dos *scaffolds* compósitos estudados durante o período de ensaio, variações essas expressas na Figura 52 (a e b).

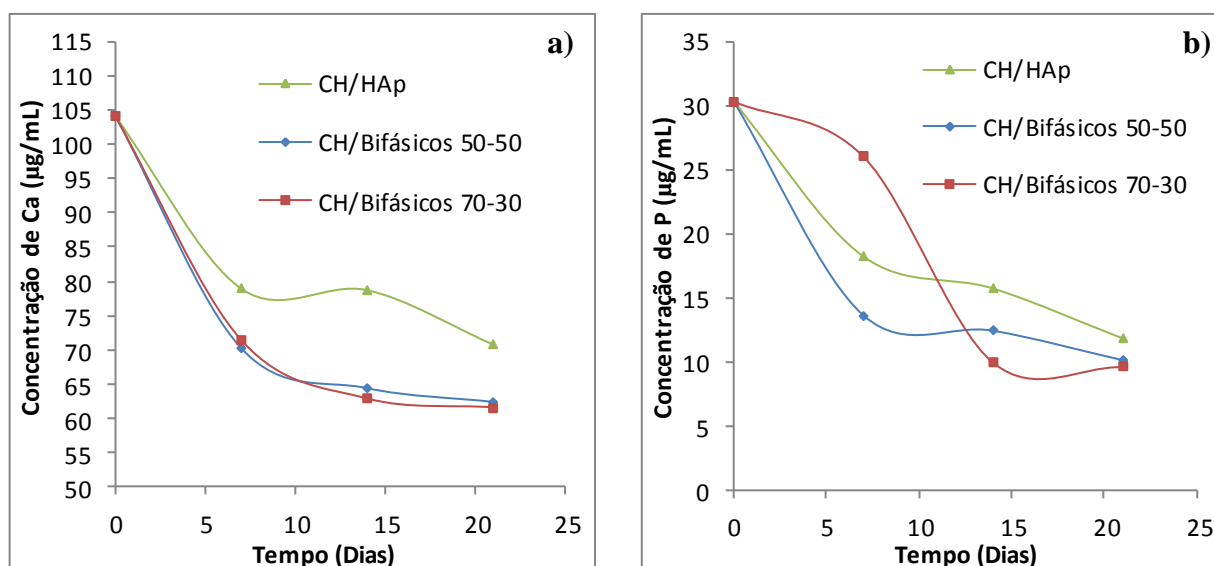


Figura 52 - Variações de concentração de a) cálcio e b) fósforo no meio de imersão dos três tipos de *scaffolds* compósitos estudados: a) variação de Ca^{2+} e b) variação de PO_4^{3-} .

Pela análise da Figura 52 observa-se que quando uma parte da HAp é substituída por β -TCP, a diminuição da concentração de cálcio em SBF aumenta (Figura 52 a)), ou seja, aumenta a precipitação de cálcio, sendo praticamente independente da quantidade de β -TCP em causa, uma vez que as curvas referentes à imersão dos *scaffolds* bifásicos são praticamente coincidentes. No que diz respeito à concentração de fósforo no meio de imersão (Figura 52 b)) observa-se que decorridos cerca de 15 dias as composições com β -TCP são mais bioativas do que as formuladas com apenas HAp, embora as curvas alusivas aos bifásicos tendam a aproximar-se com o tempo, denunciando o comportamento semelhante ao verificado na Figura 52 a). Assim, comparando os valores da concentração de cálcio e fósforo no meio fisiológico, pode afirmar-se que a bioatividade é maior para os *scaffolds* bifásicos.

Zhang *et al* [85] verificaram que *scaffolds* compósitos, contendo β -TCP, biovidro e CH apresentavam uma bioatividade que aumentava com o aumento do teor em β -TCP. Os resultados agora obtidos revelam um comportamento singular pois embora a bioatividade das composições com β -TCP seja superior à das formulações com HAp, o seu aumento com o teor de β -TCP não é claramente evidente pois aparenta ser não só fortemente dependente do tempo de ensaio como também evoluir para valores pouco afetados pelo teor de β -TCP.

O mecanismo mais aceite, através do qual os materiais bioativos formam uma camada superficial de apatite, é o da dissolução/(re)precipitação dos iões de cálcio e de fosfato na superfície do material, seguida por um crescimento epitaxial dos cristais. Segundo esta teoria, ocorre uma dissolução superficial do material, libertando-se iões Ca^{2+} . Estes aumentam o grau de sobressaturação do fluido circundante, resultando na (re)precipitação de apatite carbonatada (composto químico estruturalmente equivalente à fase mineral do osso), com consequente formação de novos cristais de apatite sobre a superfície do material [94-98]. Estes novos cristais formam-se por crescimento epitaxial, isto é a superfície do material apatítico é utilizada como local de nucleação e/ou crescimento da própria fase, ou seja, os cristais de apatite óssea. Quando estes cristais e o substrato são constituídos pelo mesmo material, a rede cristalina dos cristais está em perfeita continuidade com a rede cristalina do substrato [94]. A formação da camada de apatite promove a adesão das células ósseas e a síntese da matriz extracelular. Visto que a recém-formada camada de apatite é incorporada no tecido ósseo forma-se uma ligação que é o resultado de processos físico-químicos e biológicos que ocorrem na interface entre o osso e a superfície do biomaterial [51, 96, 99]. Todo o processo é fortemente dependente do pH e requer um pH ligeiramente alcalino para se tornar completo.

As Figuras 53 a 55 mostram a evolução da estrutura porosa dos *scaffolds* durante os testes de bioatividade.

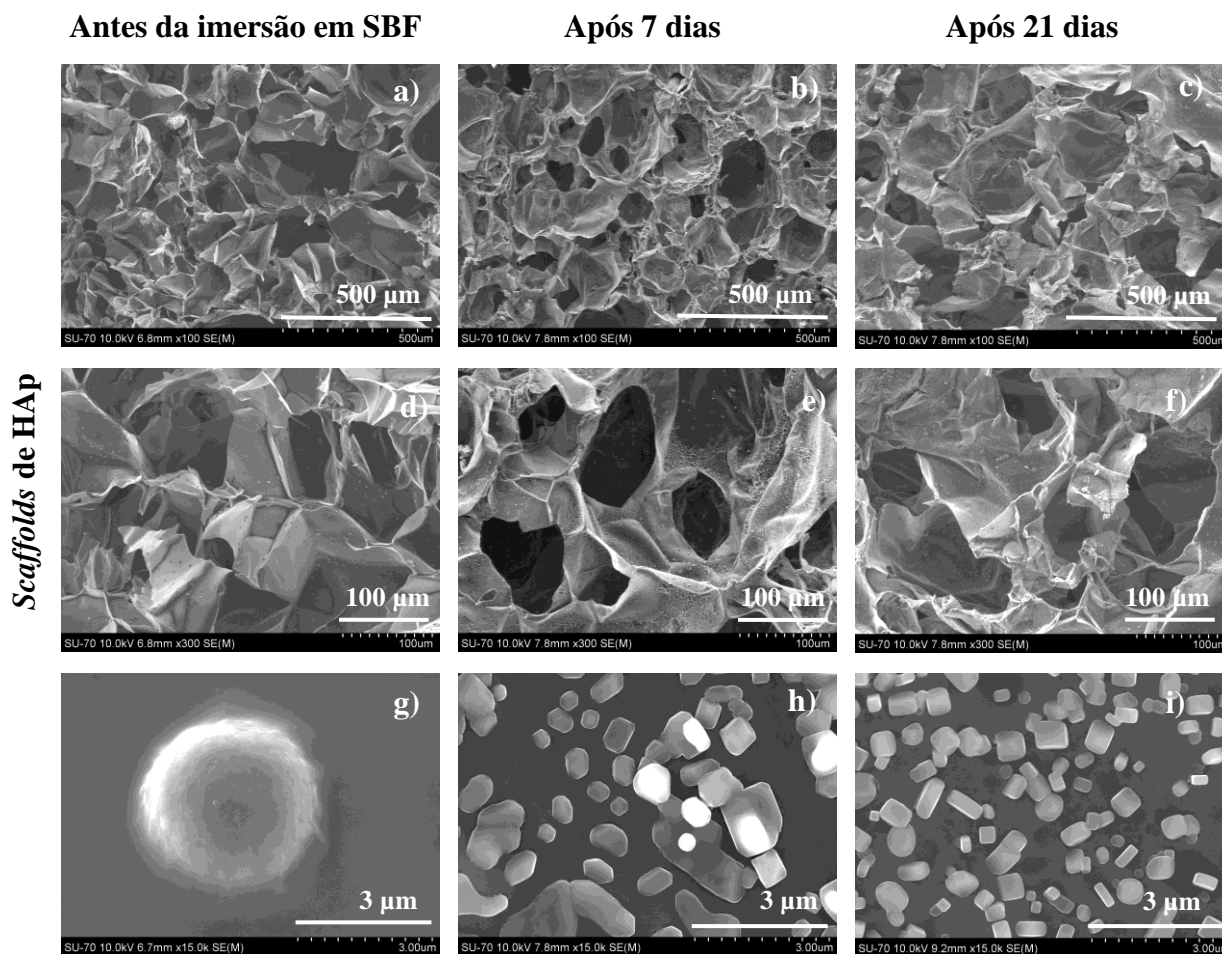


Figura 53 - Micrografias de SEM dos *scaffolds* compósitos de HAp: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias de imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i).

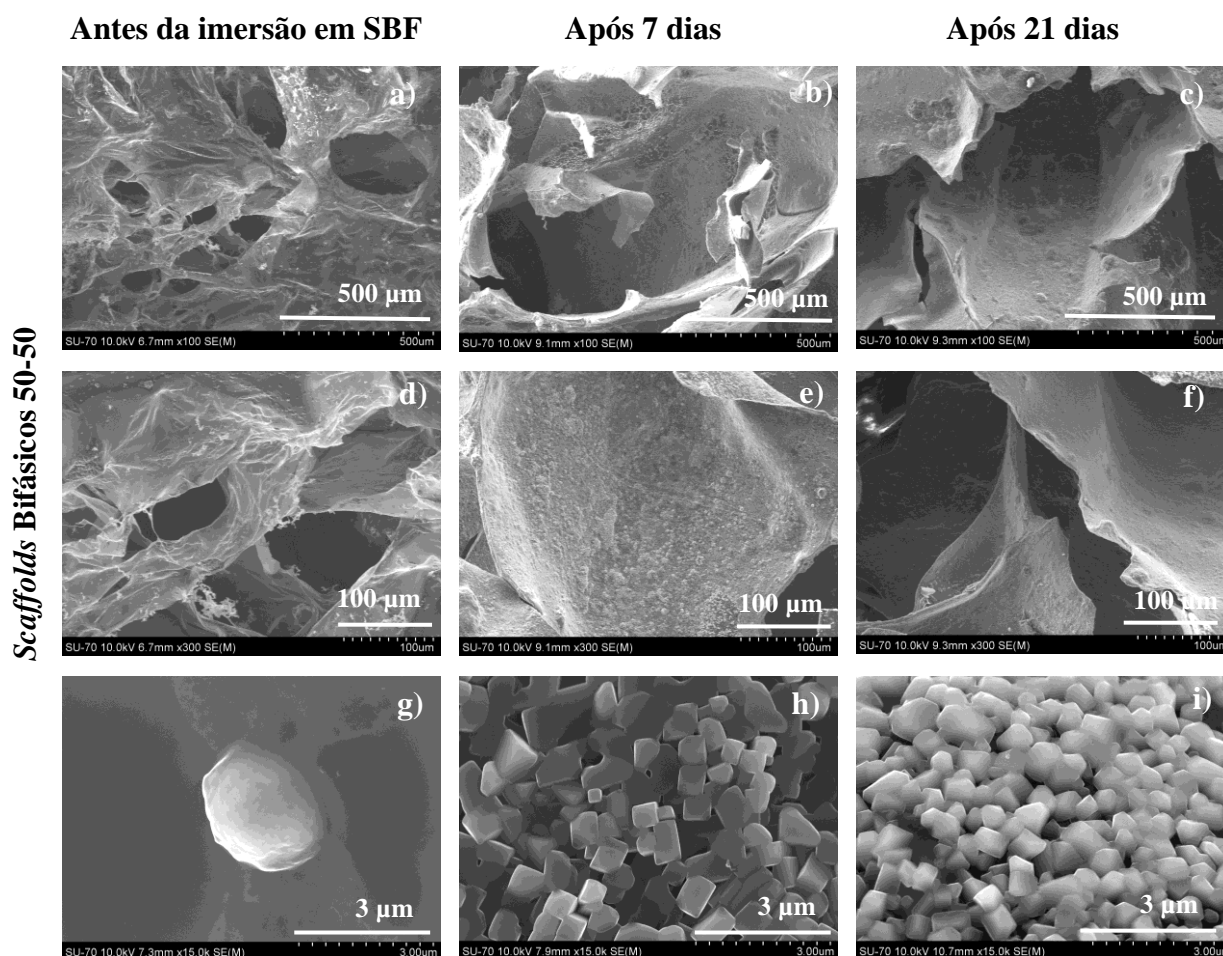


Figura 54 - Micrografias de SEM dos *scaffolds* compósitos Bifásicos 50-50: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias da imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i).

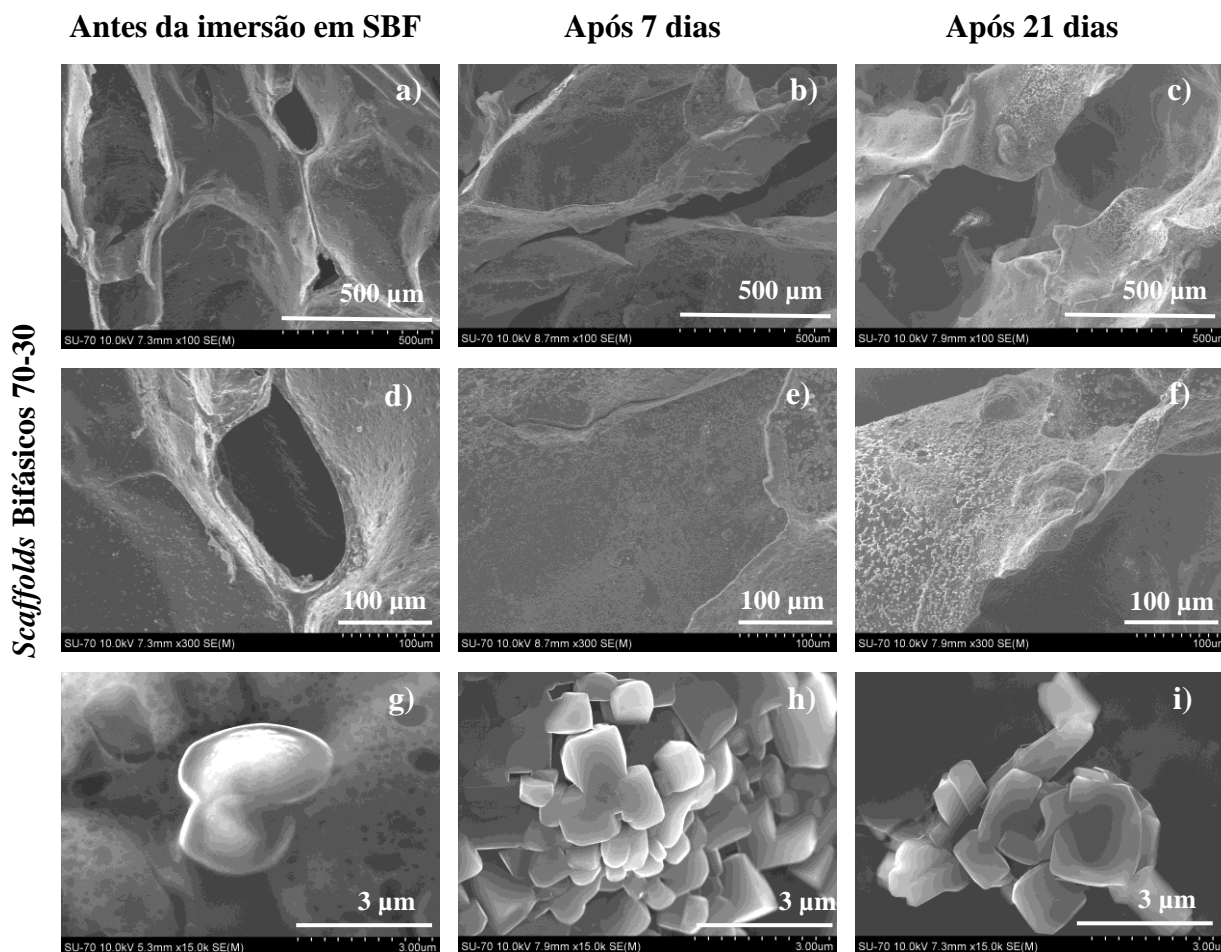


Figura 55 - Micrografias de SEM dos *scaffolds* compósitos Bifásicos 70-30: antes da imersão em SBF a), d) e g) e após 7 dias de imersão em SBF b), e) e h) e após 21 dias de imersão em SBF c), f) e i).

Após 7 e 21 dias de imersão, toda a superfície das amostras revela os efeitos da degradação em curso da matriz polimérica sendo também visíveis depósitos de cristais facetados, particularmente abundantes no caso dos *scaffolds* bifásicos 50-50.

O DRX e FTIR dos *scaffolds* após 21 dias de imersão em SBF estão representados nas Figuras 56 e 57 respectivamente.

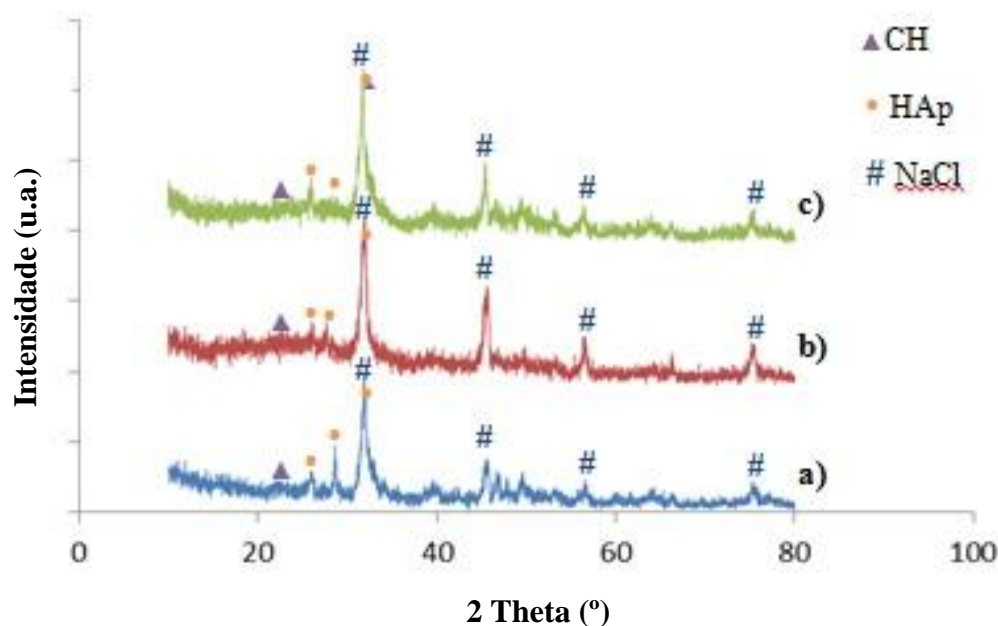


Figura 56 – Difratoograma de raio-X dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após imersão de 21 dias em SBF.

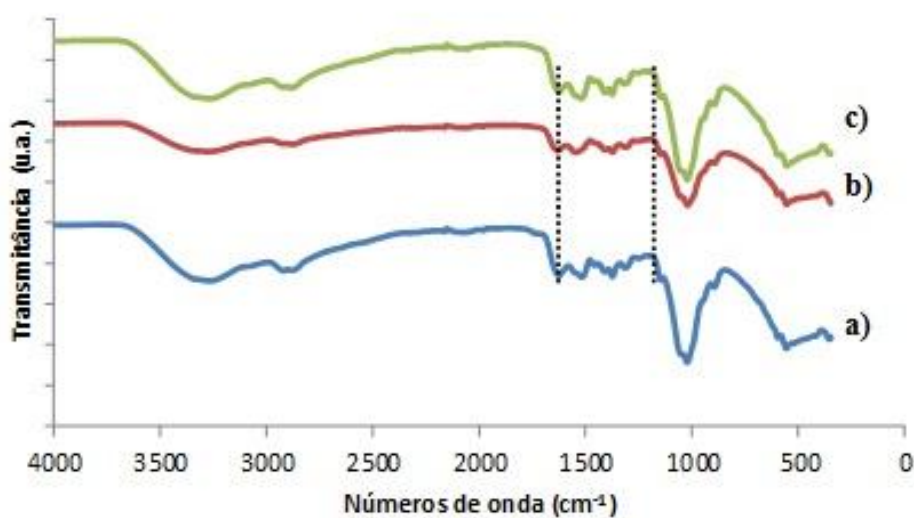


Figura 57 - Espectro de FTIR dos *scaffolds* compósitos de a) HAp, b) Bifásicos 50-50 e c) Bifásicos 70-30 após 21 dias de imersão em SBF.

Os resultados aqui reportados não evidenciam alterações significativas relativamente aos resultados obtidos após 30 dias de libertação em PBS, Figura 49 e 51, o que de facto se compreende visto que fenómenos semelhantes acontecem tanto em solução de PBS como em SBF, designadamente o desaparecimento dos picos característicos do β -

TCP iniciando a sua dissolução e possível recristalização noutro tipo de fosfato de cálcio; o aparecimento de picos característicos de NaCl que precipitam nas paredes dos *scaffolds*, podendo afirmar-se que apesar das diversas lavagens dos *scaffolds* com água desionizada não foram suficientes para eliminar o sal proveniente do SBF e PBS; a presença nos espectros de FTIR de bandas referentes a CH, HAp e DEX revelando ainda não estarem completamente dissolvidos (as linhas a tracejado no espectro de FTIR definem a região espectral onde se identificam as principais diferenças relativamente aos *scaffolds* compósitos antes de imersão em SBF).

Globalmente os resultados dos ensaios de bioatividade sugerem que os *scaffolds* produzidos têm a capacidade de induzir a precipitação de camadas apatíticas características dos materiais potencialmente bioativos mas também que sofrem degradação ao longo do tempo, em ambiente fisiológico. Estas características são consideradas como requisitos importantes em materiais a utilizar em regeneração óssea.

5.6. Biocompatibilidade

Antes da interação celular, é necessário um estudo prévio do comportamento dos *scaffolds* em meios de cultura. Se o meio de cultura se mantiver com um pH neutro, prossegue-se com os estudos celulares.

O comportamento dos *scaffolds*, em meio de cultura está ilustrado na Figura 58.



Figura 58 – *Scaffolds* compósitos em meios de cultura; as amostras do lado esquerdo dizem respeito aos *Scaffolds* de CH+0,01%GA e as amostras do lado direito aos *scaffolds* apenas de CH.

Após uma semana de incubação no meio de cultura, o *scaffold* de CH manteve-se bastante íntegro e com uma elevada elasticidade. O de CH+GA apesar de parecer mais duro, é também mais frágil e parte bastante ao manipular. Ambos os *scaffolds* evidenciaram um comportamento adequado à prossecução de ensaios celulares.

Na Figura 59 são apresentadas imagens representativas das culturas celulares estabelecidas na presença dos diferentes biomateriais, nas ampliações de 40x e de 100x.

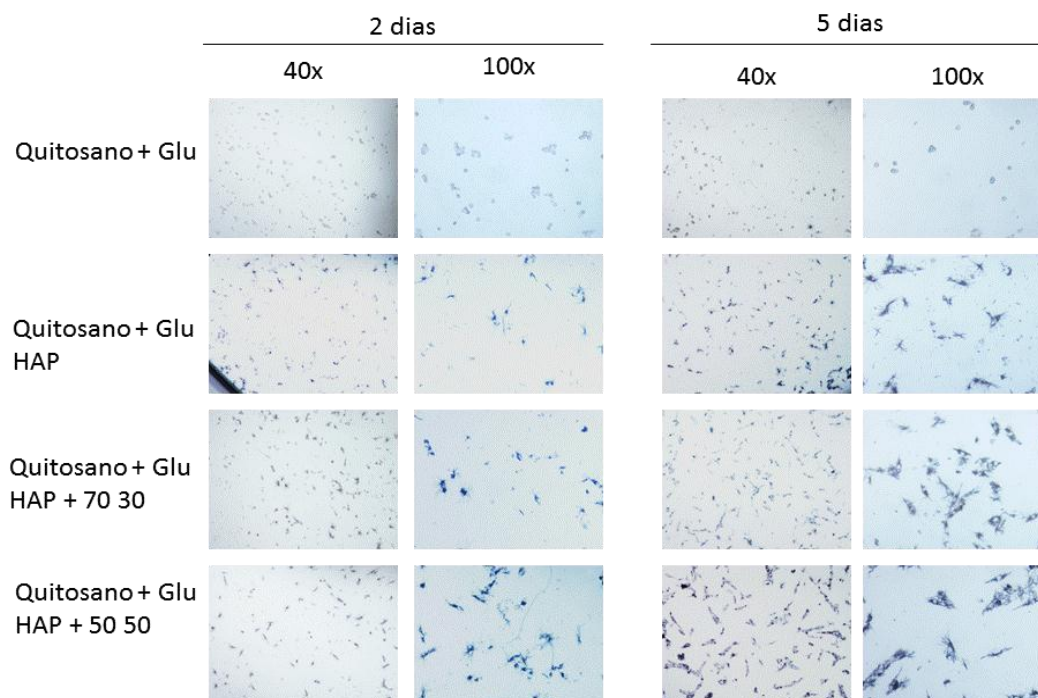


Figura 59 – Micrografias, obtidas através de microscópio ótico, dos meios de cultura após 2 e 5 dias na presença dos *scaffolds* de material base (CH+GA) e dos *scaffolds* compósitos de CH/Fosfatos de cálcio+GA.

As células cultivadas na presença do material de base apresentaram, aos 2 dias de cultura, uma morfologia arredondada com reduzidos prolongamentos citoplasmáticos e contactos intercelulares. Aos 5 dias de cultura, as células apresentaram uma morfologia semelhante, bem como um número relativo aproximado, não se verificando uma proliferação significativa entre os 2 e 5 dias de cultura.

A inclusão de HAp pareceu melhorar o desempenho biológico do material de base. Ao dia 2 observou-se a presença de um maior número de células viáveis com uma morfologia mais alongada e a presença de um número aumentado de prolongamentos citoplasmáticos, comparativamente com as culturas estabelecidas na presença do material de base. As culturas estabelecidas na presença dos materiais HAp proliferaram ativamente,

verificando-se um aumento do número de células aos 5 dias, com uma morfologia mais alongada.

Nas culturas estabelecidas na presença de materiais com β -TCP, na proporção 70/30 e 50/50, verificou-se, ao dia 2, um número aumentado de células com uma intensa coloração azul/violeta, comparativamente com as condições de cultura anteriores (materiais de base e HAp). As células proliferam ativamente entre o dia 2 e o dia 5, verificando-se um aumento significativo da densidade celular ao dia 5, e uma morfologia alongada típica com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos (filopodia) - características do fenótipo desta população celular. Nos materiais com β -TCP, a proporção de 50/50 pareceu induzir a resposta biológica mais adequada.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

No presente trabalho prepararam-se e caracterizaram-se *scaffolds* compósitos de quitosano (CH) reforçados com partículas de fosfato de cálcio (CaP), para a regeneração óssea.

Prepararam-se por atomização, três tipos de grânulos de CaP, isto é, HAp e bifásicos (β -TCP/HAp) com diferentes proporções (β -TCP/HAp), carregados com um fármaco modelo, a dexametasona (DEX), e procedeu-se à sua incorporação em matrizes de quitosano (CH) reforçadas com um agente reticulante, o glutaraldeído (GA). As matrizes foram obtidas por congelamento e liofilização.

Os *scaffolds* compósitos foram caracterizados em termos de microestrutura, composição de fases cristalinas e comportamentos mecânicos, avaliando-se o efeito da inclusão de diferentes CaP e da incorporação do GA nas propriedades mecânicas.

Construíram-se perfis de libertação da DEX e avaliou-se a bioatividade dos *scaffolds* bem como o comportamento de culturas celulares MG-63 na presença dos diferentes *scaffolds*.

Apresenta-se de seguida uma síntese das principais conclusões do trabalho concretizado seguindo-se algumas sugestões relativas à realização de trabalho futuro.

Grânulos atomizados

A atomização de suspensões de diferentes partículas produziu grânulos micrométricos esféricos, cuja cristalinidade não foi alterada pelo processo de atomização, e capazes de libertar a DEX. Observou-se que os grânulos que contêm HAp e β -TCP simultaneamente (grânulos bifásicos) dissolvem-se mais rapidamente do que os grânulos apenas de HAp sugerindo assim uma taxa de dissolução maior para o β -TCP do que para a HAp como reportado na literatura. Uma vez que o fármaco se difunde a partir dos grânulos seria de se esperar uma maior libertação no caso dos grânulos bifásicos. No entanto verificou-se que os grânulos bifásicos, ao contrário dos grânulos de HAp, libertaram o fármaco em menor quantidade o que pode ser explicado por fenómenos de dissolução/reprecipitação com formação de uma camada superficial de precipitado nos grânulos bifásicos que constitui uma barreira à difusão da DEX. Analisando os perfis de

libertação do fármaco, verificou-se também que após 10min houve uma libertação quase total da DEX, surgindo então a necessidade de incorporar os grânulos carregados com a DEX numa matriz polimérica.

Scaffolds compósitos de CH

Scaffolds macroporosos interconectados com tamanho de poro na gama 50-500 μ m e porosidade superior a 75% foram produzidos por congelamento e liofilização. Os *scaffolds* foram caracterizados em termos de microestrutura, composição de fases cristalinas, ligações químicas e comportamentos mecânicos e bioativos.

A difração de raio-X permitiu identificar as fases cristalinas dos respetivos *scaffolds* verificando-se que apenas apresentavam picos correspondentes ao CH e aos respetivos grânulos.

Todos os *scaffolds* apresentaram o mesmo tipo de comportamento em relação às ligações químicas evidenciando picos característicos da DEX, CH e dos grânulos de CaP. Verificou-se que a incorporação tanto de partículas de CaP como de um agente de reticulação (GA) na matriz polimérica de CH aumentou a resistência mecânica dos *scaffolds*. Verificou-se ainda uma melhoria da resistência à compressão e do módulo de Young dos *scaffolds* com o aumento do teor em β -TCP, aumentando a resistência de compressão de 0,11MPa para 0,45MPa e o módulo de Young de 0,27 para 2,79MPa com a incorporação de grânulos bifásicos com um teor elevado (70%) de β -TCP.

O estudo do comportamento bioativo dos *scaffolds* evidenciou o contributo das partículas de CaP para a bioatividade do *scaffold*. Os *scaffolds* compósitos em que coexistem β -TCP e HAp evidenciaram um perfil de libertação de fármaco mais lento e bioatividade superior à dos *scaffolds* compósitos de HAp. A variação da concentração de Ca e P na solução de SBF durante a imersão dos *scaffolds* ao longo dos 21 dias indicou a formação de uma camada apatítica nos *scaffolds*.

Avaliou-se o comportamento de culturas celulares da linha MG-63 na presença dos diferentes *scaffolds*, num modelo de cultura indireto, para avaliação da proliferação/viabilidade e morfologia celulares. A inclusão de fosfatos de cálcio nos *scaffolds* de quitosano pareceu melhorar o seu desempenho biológico, verificando-se que a proporção de (β TCP/HAp) de 50/50 nos *scaffolds* compósitos pareceu induzir a resposta biológica mais adequada.

Scaffolds compósitos como SLCF

Das várias curvas de liberação de DEX decorrentes da incorporação de diferentes grânulos na matriz polimérica, evidenciou-se um perfil de liberação de DEX segundo o qual cerca de 23 e 78% da DEX é libertado ao longo de ~10h e ~30 dias, assegurando-se assim uma liberação mais lenta e prolongada do que as referidas na literatura para a DEX. Os resultados demonstraram que os *scaffolds* foram capazes de retardar a liberação do fármaco evidenciando um perfil de liberação controlada da DEX e, assim, sugerindo o seu potencial para serem utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Para concluir, pode pois afirmar-se que os *scaffolds* produzidos no presente trabalho apresentaram-se como estruturas promissoras para aplicação em ET ósseo e simultaneamente sistemas de liberação controlada de fármacos.

Trabalho futuro

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram algumas necessidades de novos estudos com objetivo de clarificar os seguintes assuntos:

- Estudos de degradação para monitorização da alteração da estrutura dos *scaffolds* durante a liberação do fármaco.
- Investigar o efeito da variação da concentração de glutaraldeído nas propriedades mecânicas dos *scaffolds* compósitos.
- Prosseguir os estudos de interação celular através do contato direto dos *scaffolds* com as células.
- Testar os *scaffolds in vivo* em ratinhos de laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Santos, C.F., *Materiais fosfocálcicos para utilização em sistemas de libertação de fármacos*, Tese de Mestrado no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro (DECV), 2005, Universidade de Aveiro.
2. Vaz, G.J.O., *Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfatos de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética*, Tese de Mestrado, 2007, Universidade Federal de Ouro Preto.
3. Pignatello, R., *Biomaterials Science and Engineering*, editora InTech, 2011.
4. Barbanti, S.H., *Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos*. Ciência e Tecnologia, 2005. **15**: p. 13-21.
5. Costa, A.C.F.M., et al., *Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações*. Revista Electrónica de Materiais e Processos, 2009. **4.3**: p. 29-38.
6. Fontes, R.A.M., *Fabrico e caracterização de scaffolds à base de fosfato de cálcio*, Tese de Mestrado no Departamento de Engenharia Mecânica, 2010, Universidade Técnica de Lisboa.
7. Marbelia, L., *Chitosan based scaffolds for bone regeneration*, Tese de Mestrado no Departamento de Física, 2011, Universidade de Aveiro.
8. Júnior, J.V.A., *Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas*, Tese de Mestrado no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, 2005, Universidade de Aveiro.
9. Duarte, A. R., Mano, J.F., e Reis, R.L., *Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology*. European Polymer Journal, 2009. **45**(1): p. 141-148.
10. Duarte, A.R., Mano, J.F., e Reis, R.L., *Dexamethasone-loaded scaffolds prepared by supercritical-assisted phase inversion*. Acta Biomater, 2009. **5**(6): p. 2054-62.
11. Dorozhkin, S.V., e Epple, M., *Biological and medical significance of calcium phosphates*. Angew Chem Int Ed 41, 2002: p. 3130-3146.
12. Junqueira, L. C. e Carneiro, J., *Histologia Básica*, 5ª edição 1982, Rio de Janeiro.
13. Dorozhkin, S., *Calcium orthophosphates*. Journal of Materials Science, 2007. **42**: p. 1061-1095.

14. Reilly, D.T., e Burstein, A.H., *The Mechanical Properties of Cortical Bone*. The Journal of Bone and Joint Surgery 1974. **56**: p. 1001-1022.
15. Gibson, L.J. e Ashby, M. F., *Cellular Solids: Structure and Properties* 1997: Cambridge University Press.
16. Wagoner, J., Herschler, B.A., *et al.*, *A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 16-30.
17. Shoufeng Y., Zhaohui D., Chee-Kai, C., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional Factors*. Tissue Engineering, 2001. **7**(6): p. 679-689.
18. Porter, J., Ruckh, T., e Popat, K., *Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies*. Biotechnol. Prog. , 2009. **25**: p. 1530-60.
19. Subia, B., *et al.*, *Biomaterial Scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*, in *Tissue Engineering* 2010. p. 141-158.
20. Demirbag, B., *et al.*, *Advanced cell therapies with and without scaffolds*. Biotechnol J, 2011. **6**(12): p. 1437-53.
21. Stevens, M.M., e George, J.H., *Exploring and Engineering the cell surface interface*. Science, 2005. **310**: p. 1135-1138.
22. Freed, L.E. e Vunjak-Novakovic G., *Culture of organized cell communities* Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **33**: p. 15-30.
23. Iakada, Y., *Surface modification of polymers for medical applications*. Biomaterials, 1994. **15**: p. 725-36.
24. Thomson, R., *et al.*, *Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone*. J Biomater Sci Polym Ed, 1995: p. 7-23.
25. Robling, A.G, Castillo, A.B., e Turner, C.H., *Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling*. Annual Reviews of Biomedical Engineering, 2006. **8**: p. 455-98.
26. Salgado, A.J., Coutinho, O.P., e Reis, R.L., *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*. Journal of Macromolecular Bioscience 2004. **4**: p. 743-65.
27. Ratner, B.D., *et al.*, *Biomaterials Science, Second Edition: An Introduction to Materials in Medicine* 2004.

28. Hench, L.L. e Wilson, J., *Surface-active biomaterials*. Science, 1984. **226**: p. 630-636.
29. Jarcho, M., *et al.*, *Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface*. Journal of Bioengineering 1977. **1**: p. 79-92.
30. Nair, L.S. e Laurencin, C.T., *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8-9): p. 762-798.
31. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 2529-2543.
32. Coelho, M.J.R., *Modulação farmacológica da interação tecido ósseo/biomateriais. Estudos in vitro.*, Tese de Doutorado, 2001, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.
33. Zamoume, O., *et al.*, *Macroporous calcium phosphate ceramic implants for sustained drug delivery*. Materials Science and Engineering: C, 2011. **31**(7): p. 1352-1356.
34. Verron, E., *et al.*, *Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review*. Drug Discov Today, 2010. **15**(13-14): p. 547-52.
35. Mano, J.F., Boesel, L.F., Neves, N.M., Reis, R.L., *Bionert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments*. Composites Science and Technology, 2004. **64**: p. 789-817.
36. Lee, K.Y., e Mooney, D.J., *Alginate: properties and biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2011. **37**(1): p. 106-126.
37. Malafaya, P.B., Silva, G.A., e Reis, R.L., *Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(4-5): p. 207-33.
38. Ribeiro, C.C., Barrias, C.C., e Barbosa, M.A., *Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4363-73.
39. Prasitsilp, M., Kongsuwan, K., Damrongchai, N., e Watts, P., *Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. **11**: p. 773-778.
40. Avezedo, V.V., *et al.*, *Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais*. Revista Electrónica de Materiais e Processos, 2007. **2.3**: p. 27-34.

41. Dash, M., *et al.*, *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(8): p. 981-1014.
42. Zhang, Y. e Zhang, M., *Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release*. Inc. J Biomed Mater Res, 2002. **62**: p. 378-386.
43. Kean, T., e Thanou, M., *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(1): p. 3-11.
44. Mansouri, S., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., e Fernandes, J.C., *Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004. **57**: p. 1-8.
45. Madhally, S., *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 1999. **20**: p. 1133-42.
46. Duarte, A.R.C., Mano, J.F., e Reis, R.L., *The role of organic solvent on the preparation of chitosan scaffolds by supercritical assisted phase inversion*. The Journal of Supercritical Fluids, 2010.
47. Zhang, Y., e Zhang M., *Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **62**: p. 378-386.
48. Ji, C., *et al.*, *Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂*. Acta Biomater, 2011. **7**(4): p. 1653-64.
49. Júnior, E., *Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial.*, Tese de Doutorado, 2008, Universidade Federal de Minas Gerais.
50. Hsieh, C., *et al.*, *Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds*. Carbohydrate Polymers, 2007. **67**(1): p. 124-132.
51. Jameela, S.R., Misra, A., *et al* *Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1994: p. 621-32.

52. Malafaya, P.B., *et al.*, *Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 3914-26.
53. Martel-Estrada, S.A., *et al.*, *In vitro bioactivity of chitosan-poly(D,L-lactide-co-glycolide) composites*. Material Letters, 2010. **65**: p. 137-141.
54. Santos, L.A., *Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica*, Tese de Doutorado no Departamento de Engenharia Mecânica 2002, Universidade Estadual de Campinas.
55. Aoki, H., *et al*, *Medical Applications of Hydroxyapatite* 1994: Ishiyaku EuroAmerica, Inc.
56. Komlev, V.S. e Barinov, S.M., *Porous spherical hydroxyapatite granules: processing and characterization*. Technol. Adv. Mater, 2003. **4**: p. 503-508.
57. Welch J. H., e Gutt, W., *High-temperature studies of the system calcium oxide–phosphorus pentoxide*. Journal of the Chemical Society, 1961: p. 4442-4444.
58. Böhner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, International Journal of the Care of the Injured 2000: p. 37-47.
59. Kivrak, N., e Tas, C.A., *Synthesis of Calcium Hydroxyapatite –Tricalcium Phosphate (HA–TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior*. Journal of American Ceramic Society 1998: p. 2245-52.
60. Böhner, M., *Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery*. European Spine Journal, 2001. **10**: p. 114-121.
61. Fernández, E., *et al.*, *Calcium phosphate bone cements for clinical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1999: p. 169-176.
62. Zhang, Y. e Zhang, M., *Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. **282**: p. 159-64.
63. Irsen, S. H., *et al.*, *Anatomical rapid prototyping models with soft and hard tissue representation for surgical planning*. Journal Technology and Health Care - Special issue, 2004. **12**: p. 110-111.
64. Peter, X.M.A., *Scaffolds for tissue engineering*. Materials Today 2004: p. 30-40.

65. Whang, K., Thomas, C.H., e Healy, K.E., *A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds*. Polymer, 1995. **36**: p. 837-42.
66. Liu, C., Xia, J., e Czernuszka, J.T., *Design and Development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*. Chemical Engineering Research and Design, 2007. **85**: p. 1051-1064.
67. Shoufeng, Y., Zhaohui, D., Chee-Kai, C., *The design of scaffolds for use in tissue engineering*. Journal of Tissue Engineering, 2001. **7**.
68. Ma, P.X., e Zhang, R., *Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **56**: p. 469-77.
69. Ma, P.X., e Zhang, R., *Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **46**: p. 60-72.
70. Mooney, D.J., *et al.*, *Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents*. Biomaterials, 1996. **17**: p. 1417-22.
71. Subia, B., Kundu, J., e Kundu, S.C., *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*, in *Tissue Engineering 2010*, In-Teh. p. 141-158.
72. Saltzman, W.M., *Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy*, ed. N.C.S.U. Keith E. Gubbins 2001: Oxford University Press, Inc.
73. Gutierrez, M., *et al.*, *Substitutos ósseos*. Arquivos de Medicina, 2006. **19**(4): p. 153-162.
74. Sokolsky-Papkov, M., *et al.*, *Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**: p. 187-206.
75. Jameela, S.R., e Jayakrishnan, A., *Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle*. Biomaterials, 1995: p. 760-75.
76. Santo, V., *Natural origin polymer-based nanocarriers as tools for controlled release of bioactive factors aimed to manipulate stem cells performance in bone and cartilage tissue regeneration strategies*, Tese de Doutoramento, 2012, Universidade do Minho.

77. Silva, M.A.M., *Chemical preparation and properties of calcium phosphate based materials for biomedical applications*, Tese de Mestrado no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro (DECV, 2004, Universidade de Aveiro.
78. Coelho, P.M.B.S., *Desenvolvimento de formulações de libertação de ranitidina*, Tese de Doutorado, 2007, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
79. Lopes, C.M., Lobo, J.M.S., e Costa, P., *Formas farmacêuticas de libertação modificada: polímeros hidrofílicos*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **41**(2): p. 143-154.
80. Subramaniam, M., Keeting, P.E., Rasmussen, K., Riggs, B.L., Spelsberg, T.C., *Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase, osteocalcin, and proto-oncogenes in normal human osteoblast-like cells*. Journal of Cellular Biochemistry, 1992. **50**(4): p. 411-24.
81. Son, J.S., et al., *Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres*. J Control Release, 2011. **153**(2): p. 133-40.
82. Denkbaz, E.B., Seyyal, M., e Piskin, E., *Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning*. Journal of Membrane Science, 2000(172): p. 33-38.
83. Lam, C.X.F., Mo, X.M., Teoh, S.H., Hutmacher, D.W., *Scaffold development using 3D printing with a starchbased polymer*. Materials Science & Engineering CBiomimetic and Supramolecular Systems, 2002. **20**: p. 49-56.
84. Zein, I., Tan, K.C., Teoh, S.H., *Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 1169-1185.
85. Zhang, Y. e Zhang, M., *Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000.
86. Kokubo, T. e Takadama, H., *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* Biomaterials, 2006. **27**(15): p. 2907-15.
87. Koutsopoulos, S., *Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods*. Journal of Biomed. Mater. Res., 2002. **62**(4): p. 600-612.

88. Li, Y., *et al.*, *Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1994. **5**: p. 326-331.
89. Ugarta, J.F.O., *et al.*, *Influence of processing parameters on structural characteristics of porous calcium phosphate samples: a study using an experimental design method*. Mat. Res., 2005. **8**(1): p. 71-76.
90. Costa, Jr.E.S., *et al.*, *Constructos de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticulados quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido*. Anuais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009.
91. Santos, C., *et al.*, *Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system*. Ceramics International, 2009. **35**: p. 509-513.
92. Ginebra, M.P., Traykova, T., e Planell, J.A., *Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review*. Journal of Controlled Release, 2006. **113**(2): p. 102-10.
93. Tae-Wan, K, *et al.*, *In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo*. Ceramics International, 2012. **38**: p. 1965-1974.
94. Bagambisa, F.B., Joos, U., e Schilli, W., *Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics*. Journal of Biomedical Materials Research, 1993: p. 1047-55.
95. Hulshoff, J.E.G., *et al.*, *Interfacial phenomena: an in vitro study of the effect of calcium phosphate (Ca-P) ceramic on bone formation*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998: p. 464-474.
96. Neo, M.N.T., *et al.*, *Apatite formation on three kinds of bioactive material at an early stage in vivo: A comparative study by transmission electron microscopy*. Journal of Biomedical Materials Research, 1993: p. 999-1006.
97. Jarcho, M., *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*. Journal of Clinical Orthopaedics, 1981: p. 250-279.
98. Bruijn, J.D., Blitterswijk, C.A., e Davies, J.E., *Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo*. Journal of Biomedical Materials Research, 1995: p. 89-99.
99. Bagambisa, F.B., Kappert, H.F., e Schilli, W., *Interfacial reactions of osteoblast to dental and implant materials*. J. Oral Maxillofac. Surg. , 1994: p. 52-56.1

ANEXOS

Resultados de liberação

Antes do estudo do perfil de liberação da DEX foi feita uma curva de detecção do pico máximo de absorvância para este fármaco, de forma a validar os resultados obtidos nos estudos de liberação. O valor encontrado para o pico máximo de absorvância foi de 242nm (Figura A1).

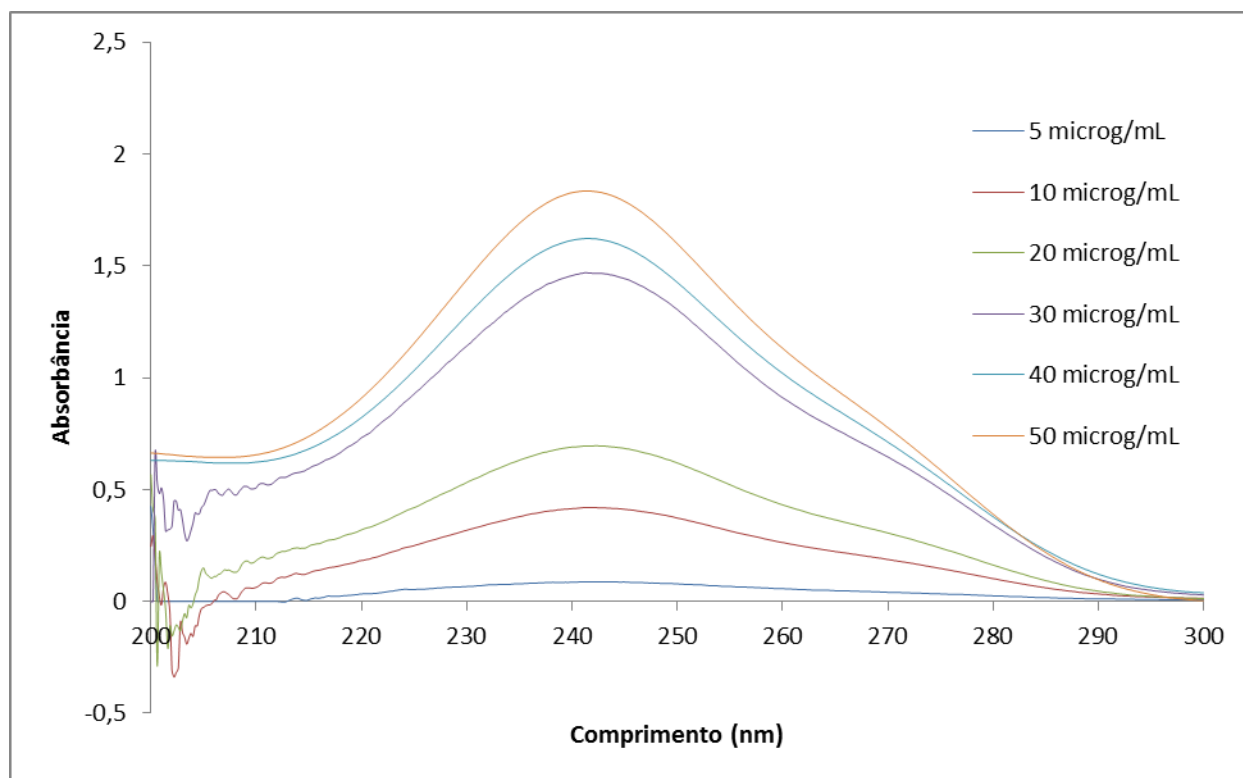


Figura A1 - Espectro da DEX, obtido por UV-Visível, para detecção do pico máximo de absorvância do fármaco.

A reta de calibração da DEX foi feita preparando soluções de DEX com diferentes concentrações (5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL) numa solução de PBS. A absorvância foi observada por espectroscopia UV-Visível e anotada na seguinte tabela:

Tabela A1 – Diferentes valores de concentração conhecida da DEX e as respectivas absorvâncias.

| Amostra | Concentração µg/mL | Absorvância |
|---------|-----------------------|-------------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 5 | 0,097 |
| 3 | 10 | 0,427 |
| 4 | 20 | 0,727 |
| 5 | 30 | 1,528 |
| 6 | 40 | 1,731 |
| 7 | 50 | 1,976 |

Através dos dados acima referidos, consegue-se traçar a reta de calibração da DEX:

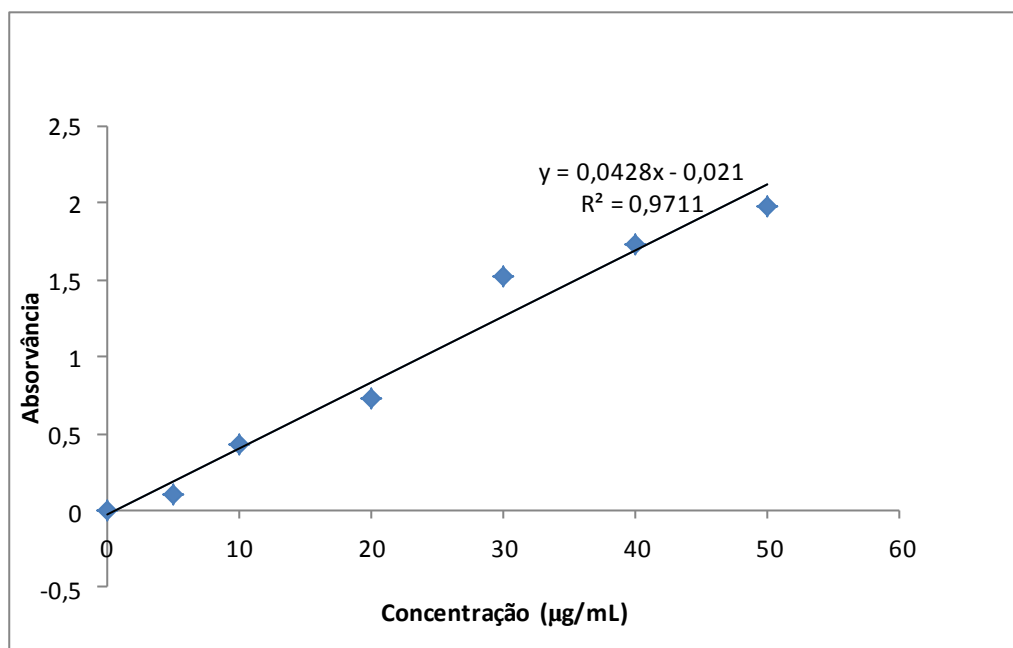


Figura A2 – Reta de calibração da DEX.

Baseado na equação linear acima, para uma absorvância conhecida (através da espectroscopia UV-Visível) a concentração pode ser calculada por:

$$x = \frac{y - 0,021}{0,0428} \text{ (µg/mL)} \quad (\text{Eq. A1})$$

Quantidade de fármaco nos *Scaffolds* liofilizados:

- 100g de solução compósita contêm 2% de CH (2g) e 1% de grânulos atomizados (1g)
- Quantidade de fármaco nos grânulos (10% x 1)=100mg
- Quantidade de fármaco no *Scaffold* liofilizado = 100mg/(2g de CH+1g de HAp)
= 100mg de DEX/3g de *Scaffold* liofilizado



Cada *scaffold* contém 10mg de fármaco

Percentagem de fármaco libertado:

$$\% \text{ fármaco libertado} = \frac{\text{Massa de fármaco libertado}}{10 \text{ mg DEX}} \quad (\text{Eq. A2})$$

- Massa de fármaco libertado:

Para t=10minutos vem

$$\text{Massa de fármaco libertado} = m_1 + m_1'$$

Para t=30minutos vem

$$\text{Massa de fármaco libertado} = m_2 + m_2' + m_1$$

Para t=1hora vem

$$\text{Massa de fármaco libertado} = m_3 + m_3' + m_2 + m_1 \text{ e assim sucessivamente.}$$

NOTA: $m_1 + m_1' = C_t \times 5\text{mL PBS} + C_t \times 195\text{mL PBS}$

C_t =concentração de DEX a um dado tempo ($\mu\text{g/mL}$):

$$C_t = [\text{absorvância} - (-0,021)] / 0,0428$$

Quantidade absoluta de fármaco libertado:

$$\text{Quantidade absoluta de fármaco} = \frac{\text{mg de DEX libertada}}{\text{mg de pó}} \quad (\text{Eq. A3})$$

Na Figura A3 está representado o difratograma de raio-X da DEX sendo visíveis os picos caraterísticos a 900 e 1650cm⁻¹.

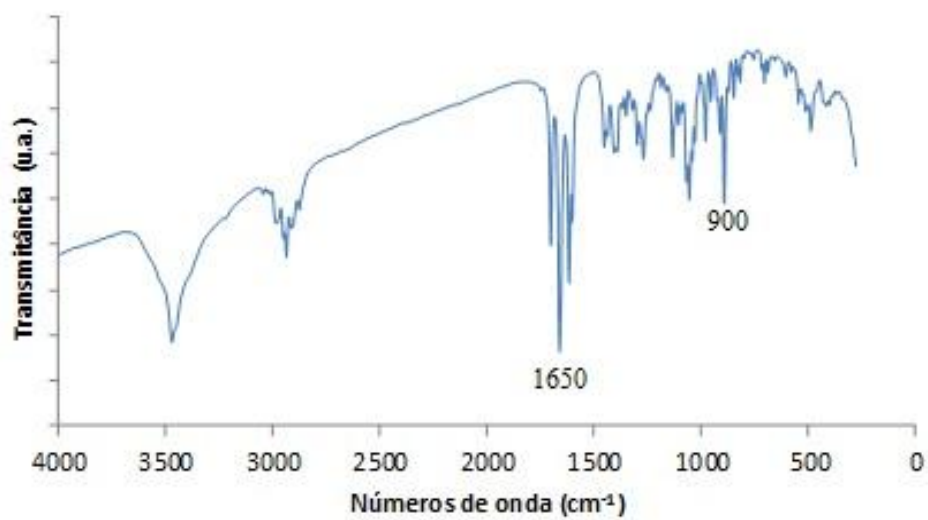


Figura A3 – Difratograma de raio-X da dexametasona.

Nas tabelas que se seguem (Tabela A2 a A4) estão representados os resultados obtidos para os grânulos de HAp, Bifásicos 50-50 e Bifásicos 70-30.

Grânulos de HAp

Tabela A2 – Resultados experimentais para os grânulos de HAp.

| Tempo | Absorvância | Ct (µg/mL) | massa de fármaco libertado (µg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg grânulos |
|-----------------|--------------------|-------------------|--|----------------------------|---------------------------|
| 10 min | 1,765 | 37,054 | 741,1 | 82,3 | 0,07411 |
| 30 min | 1,774 | 37,241 | 744,8 | 82,8 | 0,07448 |
| 1 hora | 1,781 | 37,386 | 747,7 | 83,1 | 0,07477 |
| 2 horas | 1,789 | 37,552 | 751,0 | 83,4 | 0,07510 |
| 3 horas | 1,811 | 38,008 | 760,2 | 84,5 | 0,07602 |
| 5 horas | 1,822 | 38,237 | 764,7 | 85,0 | 0,07647 |
| 10 horas | 1,837 | 38,548 | 771,0 | 85,7 | 0,07710 |
| 18 horas | 1,849 | 38,797 | 775,9 | 86,2 | 0,07759 |
| 1 dia | 1,861 | 39,046 | 780,9 | 86,8 | 0,07809 |
| 2 dias | 1,921 | 40,290 | 805,8 | 89,5 | 0,08058 |
| 3 dias | 1,955 | 40,996 | 819,9 | 91,1 | 0,08199 |
| 4 dias | 1,976 | 41,432 | 828,6 | 92,1 | 0,08286 |
| 8 dias | 1,976 | 41,432 | 828,6 | 92,1 | 0,08286 |
| 30 dias | 1,976 | 41,432 | 828,6 | 92,1 | 0,08286 |

Grânulos Bifásicos 50-50

Tabela A3 – Resultados experimentais para os grânulos bifásicos 50-50.

| Tempo | Absorvância | Ct (µg/mL) | massa de fármaco libertado (µg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg grânulos |
|-----------------|--------------------|-------------------|--|----------------------------|---------------------------|
| 10 min | 1,465 | 30,830 | 616,6 | 68,5 | 0,06166 |
| 30 min | 1,472 | 30,975 | 619,5 | 68,8 | 0,06195 |
| 1 hora | 1,579 | 33,195 | 663,9 | 73,8 | 0,06639 |
| 2 horas | 1,582 | 33,257 | 665,1 | 73,9 | 0,06651 |
| 3 horas | 1,602 | 33,672 | 673,4 | 74,8 | 0,06734 |
| 5 horas | 1,622 | 34,087 | 681,7 | 75,7 | 0,06817 |
| 10 horas | 1,639 | 34,440 | 688,8 | 76,5 | 0,06888 |
| 18 horas | 1,645 | 34,564 | 691,3 | 76,8 | 0,06913 |
| 1 dia | 1,656 | 34,793 | 695,9 | 77,3 | 0,06959 |
| 2 dias | 1,671 | 35,104 | 702,1 | 78,0 | 0,07021 |
| 3 dias | 1,675 | 35,187 | 703,7 | 78,2 | 0,07037 |
| 4 dias | 1,675 | 35,187 | 703,7 | 78,2 | 0,07037 |
| 8 dias | 1,675 | 35,187 | 703,7 | 78,2 | 0,07037 |
| 30 dias | 1,675 | 35,187 | 703,7 | 78,2 | 0,07037 |

Grânulos Bifásicos 70-30

Tabela A4 – Resultados Experimentais para os grânulos bifásicos 70-30.

| Tempo | Absorvância | Ct (µg/mL) | massa de fármaco libertado (µg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg grânulos |
|-----------------|--------------------|-------------------|--|----------------------------|---------------------------|
| 10 min | 1,299 | 27,386 | 547,7 | 60,9 | 0,05477 |
| 30 min | 1,311 | 27,635 | 552,7 | 61,4 | 0,05527 |
| 1 hora | 1,356 | 28,568 | 571,4 | 63,5 | 0,05714 |
| 2 horas | 1,387 | 29,212 | 584,2 | 64,9 | 0,05842 |
| 3 horas | 1,395 | 29,378 | 587,6 | 65,3 | 0,05876 |
| 5 horas | 1,401 | 29,502 | 590,0 | 65,6 | 0,05900 |
| 10 horas | 1,413 | 29,751 | 595,0 | 66,1 | 0,05950 |
| 18 horas | 1,421 | 29,917 | 598,3 | 66,5 | 0,05983 |
| 1 dia | 1,435 | 30,207 | 604,1 | 67,1 | 0,06041 |
| 2 dias | 1,443 | 30,373 | 607,5 | 67,5 | 0,06075 |
| 3 dias | 1,457 | 30,664 | 613,3 | 68,1 | 0,06133 |
| 4 dias | 1,457 | 30,664 | 613,3 | 68,1 | 0,06133 |
| 8 dias | 1,457 | 30,664 | 613,3 | 68,1 | 0,06133 |
| 30 dias | 1,457 | 30,664 | 613,3 | 68,1 | 0,06133 |

Nas tabelas seguintes (Tabela A5 a A7) estão representados os resultados obtidos para os *scaffolds* de HAp, Bifásicos 50-50 e Bifásicos 70-30 respetivamente.

Scaffolds de HAp

Tabela A5 – Resultados experimentais obtidos para os *scaffolds* de HAp.

| Tempo | Absorvância | ct | massa de fármaco libertado(μg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg pó |
|---------|-------------|--------|--------------------------------|---------------------|--------------|
| 10 min | 0,041 | 1,286 | 257,3 | 2,6 | 0,00257 |
| 30 min | 0,152 | 3,589 | 717,8 | 7,2 | 0,00718 |
| 1 hora | 0,185 | 4,274 | 854,8 | 8,5 | 0,00855 |
| 2 horas | 0,256 | 5,747 | 1149,4 | 11,5 | 0,01149 |
| 3 horas | 0,279 | 6,224 | 1244,8 | 12,4 | 0,01245 |
| 5 horas | 0,399 | 8,714 | 1742,7 | 17,4 | 0,01743 |
| 8 horas | 0,501 | 10,830 | 2166,0 | 21,7 | 0,02166 |
| 1 dia | 0,646 | 13,838 | 2767,6 | 27,7 | 0,02768 |
| 4 dias | 0,963 | 20,415 | 4083,0 | 40,8 | 0,04083 |
| 8 dias | 1,237 | 25,909 | 5181,9 | 51,8 | 0,05182 |
| 30 dias | 1,921 | 39,374 | 7874,8 | 78,7 | 0,07875 |

Scaffolds Bifásicos 50-50

Tabela A6 – Resultados experimentais obtidos para os scaffolds bifásicos 50-50.

| Tempo | Absorvância | ct | massa de fármaco libertado (μg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg pó |
|---------|-------------|--------|---------------------------------|---------------------|--------------|
| 10 min | 0,139 | 3,320 | 663,9 | 6,6 | 0,00664 |
| 30 min | 0,19 | 4,378 | 875,5 | 8,8 | 0,00876 |
| 1 hora | 0,192 | 4,419 | 883,8 | 8,8 | 0,00884 |
| 2 horas | 0,195 | 4,481 | 896,3 | 9,0 | 0,00896 |
| 3 horas | 0,287 | 6,390 | 1278,0 | 12,8 | 0,01278 |
| 5 horas | 0,299 | 6,639 | 1327,8 | 13,3 | 0,01328 |
| 8 horas | 0,335 | 7,386 | 1477,2 | 14,8 | 0,01477 |
| 1 dia | 0,443 | 9,627 | 1925,3 | 19,3 | 0,01925 |
| 4 dias | 0,761 | 16,224 | 3244,8 | 32,4 | 0,03245 |
| 8 dias | 1,001 | 21,203 | 4240,7 | 42,4 | 0,04241 |
| 30 dias | 1,651 | 34,689 | 6937,8 | 69,4 | 0,06938 |

Scaffolds Bifásicos 70-30

Tabela A7 – Resultados experimentais obtidos para os scaffolds bifásicos 70-30.

| Tempo | Absorvância | ct | massa de fármaco libertado (µg) | % fármaco libertado | mg DEX/mg pó |
|---------|-------------|--------|---------------------------------|---------------------|--------------|
| 10 min | 0 | 0,436 | 87,1 | 0,9 | 0,00087 |
| 30 min | 0,054 | 1,556 | 311,2 | 3,1 | 0,00311 |
| 1 hora | 0,146 | 3,465 | 692,9 | 6,9 | 0,00693 |
| 2 horas | 0,152 | 3,589 | 717,8 | 7,2 | 0,00718 |
| 3 horas | 0,163 | 3,817 | 763,5 | 7,6 | 0,00763 |
| 5 horas | 0,172 | 4,004 | 800,8 | 8,0 | 0,00801 |
| 8 horas | 0,185 | 4,274 | 854,8 | 8,5 | 0,00855 |
| 1 dia | 0,268 | 5,996 | 1199,2 | 12,0 | 0,01199 |
| 4 dias | 0,567 | 12,199 | 2439,8 | 24,4 | 0,02440 |
| 8 dias | 0,928 | 19,689 | 3937,8 | 39,4 | 0,03938 |
| 30 dias | 1,55 | 32,593 | 6518,7 | 65,2 | 0,06519 |

Captação de água, Degradação, Porosidade e Densidade

A captação de água e a degradação depois de libertação em PBS foi calculada de acordo com as seguintes equações:

$$\% \text{ captação de água} = \frac{W_w - W_i}{W_i} \times 100 \quad (\text{Eq. A4})$$

$$\% \text{ perda de peso} = \left| \frac{W_f - W_i}{W_i} \right| \times 100 \quad (\text{Eq. A5})$$

Na Tabela A8 estão representados alguns dados referentes ao peso das amostras que ajudam a calcular a captação de água e degradação. Para a determinação da **porosidade e densidade**, o peso dos *scaffolds* de HAp, bifásicos 50-50 e bifásicos 70-30 foi de 0,2711, 0,2504 e 0,2881g respetivamente.

Tabela A8 – Resultados experimentais obtidos para os diferentes *scaffolds*.

| | <i>Scaffolds</i> de HAp | <i>Scaffolds</i> bifásicos 50-50 | <i>Scaffolds</i> bifásicos 70-30 |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Peso amostra inicial (W_i) | 0,2708 | 0,2512 | 0,2481 |
| Peso amostra seca (W_f) | 0,4212 | 0,4401 | 0,4449 |
| Peso amostra molhada (W_w) | 5,9852 | 5,2531 | 4,7056 |
| Captação de água (%) | 2110 | 1991 | 1797 |
| Degradação (%) | 55 | 75 | 79 |
| Porosidade (%) | 88 | 86 | 75 |
| Densidade (g/cm^3) | 0,06 | 0,07 | 0,09 |

O SBF é um fluido preparado com concentrações de íons equivalentes aos mesmos no plasma sanguíneo humano, como mostrado na Tabela A9.

Tabela A9 - Comparação da concentração dos íons no plasma sanguíneo e no SBF.

| Íão | Concentração do íão | |
|---------------------|---------------------|-------|
| | Plasma sanguíneo | SBF |
| Na^+ | 142,0 | 142,0 |
| K^+ | 5,0 | 5,0 |
| Mg^{2+} | 1,5 | 1,5 |
| Ca^{2+} | 2,5 | 2,5 |
| Cl^- | 103,0 | 147,8 |
| HCO_3^- | 27,0 | 4,2 |
| HPO_4^{2-} | 1,0 | 1,0 |
| SO_4^{2-} | 0,5 | 0,5 |

